



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

**CARACTERIZACIÓN DE LA LEVADURA *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* COMO
MICROORGANISMO PROBIÓTICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y
DE LA SALUD**

PRESENTA:

ANA SELENE MENDOZA GARDEAZÁBAL

BAJO LA DIRECCIÓN DE

D R. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

San Agustín Tlaxiaca, Hgo.

Mayo 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

COORDINADOR DEL PROGRAMA

Of. No MCBS/2013/13

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Lic. Ana Selene Mendoza Gardezabal
Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico", con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
PRIMER VOCAL	DR. ANDRÉS SALAS CASAS
SECRETARIO	DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES
SUPLENTE	DR. EDUARDO OSIRIS MADRIGAL SANTILLÁN
SUPLENTE	DRA. ARACELI ORTIZ POLO

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 28 de enero de 2013

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR

M.C. ESP. MARICELA GUEVARA CABRERA
COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Laboratorio de Materiales Dentales / Clínica de Odontología Ciudad del Conocimiento carretera Pachuca Tulancingo Km. 4.5
Mineral de la Reforma Hgo. C.P. 42184 Tel: (771) 7172000 ext. 6991 correo electrónico mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx



DEDICATORIA

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas sin las cuales este trabajo de investigación no hubiera sido posible, y así mismo dedicarles lo que se construyó con mucho esfuerzo.

Principalmente a mi familia, a mi papá por ser mi motivo de inspiración día con día, mi gran ejemplo a seguir, mi motor en la vida, por tener siempre confianza en mí, por su buen ejemplo y por tener siempre una palabra de aliento ante cualquier situación; a mi mamá que siempre tiene un abrazo, siendo mi motivo para levantarme todos los días y tratar de parecerme un poco más a ella, a mi hermano que siempre está conmigo, quien me hace reír y me hace ver que en la vida hay muchas otras cosas por las cuales luchar y salir adelante, que a pesar de todo hay que tratar de superarse y seguir adelante, a mis abuelos, que siempre están conmigo apoyándome, por todas sus bendiciones, cariño, y amor hacia mí, a ti Lobo (Michael), no sé qué haría sin ti, ya que mejor que nadie sabe el esfuerzo de todo esto, agradezco tu apoyo incondicional siempre, tu cariño y amor, sin todos ustedes no se hubiera completado esta etapa tan importante en mi vida, los quiero mucho, y por último pero no menos importante a Dios por permitirme vivir una etapa más y tratar de superarme todos los días.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Marco Antonio Becerril Flores, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y poder concluir esta importante etapa.

Al mis asesores, por su tiempo y por haber decidido participar en este proyecto de investigación, Dr. Eduardo Osiris, Dra. Guadalupe López, Dra. Araceli Ortiz, Dr. Andrés Salas.

A mi Familia, Mamá, Papá, Pepe, por su paciencia, todo su amor y cariño durante todo este tiempo, son mi motor en la vida.

Michael De La Cruz Pantoja, gracias por todo tu apoyo siempre, en lo personal y lo profesional, por estar conmigo Te amo.

A mis compañeros del laboratorio los que aún siguen y los que ya no, Michael César, Fred, Erika, Gil, Denisse, el trabajo en el laboratorio realmente es menos pesado cuando se tiene a compañeros tan lindos como ustedes, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, todas los buenos momentos que me permitieron vivir a su lado.

A Paty González por todo el apoyo a mí y a mis compañeros, eres como una mamá para todos muchas gracias por toda la ayuda te quiero mucho.

INDICE GENERAL

INDICE

I INTRODUCCION.....	1
II ANTECEDENTES.....	2
2.3 MARCO TEÓRICO.....	3
2.3.1 Alimentos funcionales	3
2.3.1.1 Probióticos	4
2.3.1.2 Beneficios inmunológicos de un probiótico.....	4
2.3.1.3 Beneficios de carácter no inmunológico	5
2.3.1.3.1 Refuerzo de la barrera gastrointestinal	5
2.3.1.3.2 Mantenimiento de la flora intestinal normal.....	6
2.3.1.3.3 Uso y control en la intolerancia a la lactosa	6
2.3.1.3.4 Reducción del colesterol.....	7
2.3.1.3.5 Valor nutritivo	7
2.3.1.3.6 Competencia con bacterias patógenas	7
2.3.1.3.7 Efecto de los probióticos en distintas patologías	8
2.3.1.3.7.1 Diarrea.....	8
2.3.1.3.7.2 Cáncer	9
2.3.1.3.7.3 Enfermedad inflamatoria intestinal.....	9
2.3.1.3.7.4 Alergias	10
2.3.1.4 Criterios para la evaluación de un microorganismo con capacidad probiótica	10
2.3.1.5 Pruebas de capacidad probiótica <i>in vitro</i>	12
2.3.1.5.1 Tolerancia a sales biliares	12
2.3.1.5.2 Tolerancia al pH estomacal.....	13
2.3.1.5.3 Resistencia a jugos gástricos.....	13
2.3.1.5.4 Adhesión celular.....	14
2.3.1.5.5 Cultivo celular en intestinos <i>in vitro</i>	14
2.3.1.6 Pruebas de capacidad probiótica <i>in vivo</i>	15
2.3.1.7 Clasificación de microorganismos probióticos	15
2.3.1.7.1 Probióticos procariotas	15

2.3.1.7.2 Probióticos eucariotes.....	16
2.3.1.7.2.1 Propiedades de los microorganismos eucariotas utilizados como probióticos	16
2.3.1.7.2.2 Fuentes de probióticos eucariotas	17
2.3.1.7.2.2.1 Levaduras como microorganismos con capacidad probiótica ..	17
2.3.2 El pulque como alimento probiótico.....	18
2.3.2.1 Consumo de pulque	19
2.3.2.2 El pulque como aporte nutritivo	19
2.3.2.4 El pulque como bebida intoxicante.....	20
2.3.2.5 Microorganismos aislados del pulque.....	20
2.3.3 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo General	25
5.2 Objetivos Específicos	25
VI. MATERIAL Y METODO	26
6.1 Obtención y conservación de la cepa de <i>K. marxianus</i>	26
6.2 Determinación de la capacidad probiótica de levadura <i>K. marxianus</i> mediante ensayos <i>in vitro</i>	26
6.2.1 Prueba de resistencia a sales biliares	27
6.2.2 Estabilidad de la levadura al pH del estómago	27
6.2.3 Resistencia a jugo gástrico	28
6.2.4 Prueba de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en presencia de la levadura <i>K. marxianus</i> en un ensayo <i>in vitro</i>	28
6.3 Determinación de la capacidad probiótica de levadura <i>K. marxianus</i> mediante ensayos <i>in vivo</i>	29
6.3.1 Curva de Crecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i>	29
6.3.2 Establecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> en intestino grueso y delgado en un modelo de ratones CD-1.....	30
6.3.3 Cinética de colonización de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de ratones CD-1.....	31

6.3.4 Cinética de colonización de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de ratones CD-1 tras la administración de la levadura durante 7 días de incubación.	32
6.4. Análisis estadístico	33
VII. RESULTADOS	34
7.1 Determinación de la capacidad probiótica de levadura <i>K. marxianus</i> mediante ensayos <i>in vitro</i>	34
7.1.1 Tolerancia a sales biliares	34
7.1.2 Estabilidad al pH estomacal.....	35
7.1.3 Tolerancia al jugo gástrico	35
7.1.4 Curva de crecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i>	37
7.1.5 Prueba de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> en presencia de la levadura <i>K. marxianus</i> en un ensayo <i>in vitro</i>	37
7.2 Determinación de la capacidad probiótica de levadura <i>K. marxianus</i> mediante ensayos <i>in vivo</i>	41
7.2.1 Establecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de intestino grueso e intestino delgado de ratones CD-1	41
7.2.2 Cinética de colonización de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de ratones CD-1	44
7.2.3 Cinética de colonización de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de ratones CD-1 durante 7 días de administración	44
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES	51
X. BIBLIOGRAFIA	52

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Observación microscópica de la levadura <i>K. marxianus</i> colonias teñidas en color azul intenso a un campo de 100X	22
Fig. 2 Curva de crecimiento de <i>K.marxianus</i>	37
Fig. 3. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>K. marxianus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
Fig. 4. Ensayo de inhibición de crecimiento de <i>K.marxianus</i> y <i>Escherichia coli</i>	39
Fig. 5. Observación de las muestras del ensayo de inhibición del crecimiento contra un microorganismo patógeno	39
Fig. 6. Tinción de Gram tomada de los pozos inoculados con <i>K. marxianus</i> en presencia de <i>Escherichia coli</i> para el ensayo de inhibición	40
Fig. 7 Levadura <i>K. marxianus</i> presente en intestino grueso y delgado del ratón 1.....	41
Fig. 8. Levadura <i>K. marxianus</i> presente en intestino grueso y delgado del ratón 2.....	42
Fig. 9. Levadura <i>K. marxianus</i> presente en intestino grueso y delgado del ratón 3.....	42
Fig. 10. Levadura <i>K. marxianus</i> presente en intestino grueso y delgado del ratón 4.....	43
Fig. 11. Levadura <i>K. marxianus</i> presente en intestino grueso y delgado del ratón 5.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la tolerancia a sales biliares	34
Tabla 2 Resultados de la prueba de estabilidad de pH estomacal.	35
Tabla 3 Resultados de la prueba de resistencia de jugo gástrico con pH de 1.5 y 7.0.....	36
Tabla 4 Resultados del ensayo de establecimiento de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de intestino grueso y delgado en ratones CD-1	41
Tabla 5 Resultados de la cinética de colonización de la levadura <i>K. marxianus</i> en un modelo de ratones CD-1.....	44
Tabla 6 Resultados de la cinética de colonización de la levadura <i>K.marxianus</i> durante 7 días de administración.....	45

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
°C	Grados centígrados
g	Gramos
HCL	Ácido clorhídrico
Kcal	Kilocalorías
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanometros
pH	Potencial hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
YPD	Yeast Peptone Dextrose (Extracto de levadura, peptona,dextrosa)
YPG	Yest Peptone Glucose (Extracto de levadura, peptona, glucosa)

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas le proporcionan un beneficio al huésped que lo consumo, a partir de la idea de incorporar a nuestra alimentación una mayor variedad de alimentos que nos proporcionen algún beneficio para combatir los problemas gastrointestinales, se utiliza el uso de alimentos que contienen microorganismos probióticos, estos microorganismos deben de cubrir ciertos criterios para ser considerados como tal, como la resistencia a las sales biliares, al pH ácido y a los jugos gástricos, además deben poseer la capacidad de colonizar de manera temporal o permanente el intestino, y de proporcionarle un beneficio al huésped que lo consuma, en el presente trabajo se evaluó la capacidad probiótica de la levadura *Kluyveromyces marxianus* la cual mostro ser resistente a concentraciones de sales biliares de 0.05% a 0.30%, fue capaz de sobrevivir a valores de pH ácido desde 1.5 hasta 7.0, y mostro ser tolerante al jugo gástrico hasta por 24 horas, así mismo fue capaz de establecerse en el intestino en un modelo de ratones CD.1 y colonizarlo, y logro inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *Klebsiella pneumoniae*, los resultados en la presente investigación demuestran que la levadura *K. marxianus* puede ser considerada un microorganismo con capacidad probiótica.

.

ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms that when they are ingested in adequate quantities provide a benefit to the host, from the idea of bringing to our food a better option to provide us some benefit to helps us to combat gastrointestinal disorders , the use of probiotic microorganisms is a great idea, before we can consume this microorganisms must pass some specific criteria to be considered one of them, such as the resistance to bile salts, low pH, and gastric juices, and provide a benefit to the host, in the present study we evaluated the ability of the yeast *Kluyveromyces marxianus* as a probiotic, we can see in the results that *K. marxianus* can resist different concentrations of bile salt between 0.05% and 0.30%, also was able to grow in low pH values from 1.5 to 7.0. and it showed to be tolerant to gastric juice up 24 hours, *K. marxianus* was able to establish itself in the intestine of CD-1 mice model and colonize it., also achieve the inhibit the grow of pathogenic bacteria *Klebsiella pneumonia* in in vitro test. The results of this research show us that the yeast *Kluyveromyces marxianus* can be considered a probiotic microorganism.

I INTRODUCCION

El interés por mantener una salud adecuada mediante la modificación de los alimentos que consumimos se encuentra en aumento día con día buscando mejorar la microbiota intestinal con la finalidad de que esta a su vez proporcione un efecto benéfico en el ser humano. Es por esta razón que se han realizado numerosos estudios en los cuales se utilizan microorganismos vivos llamados probióticos, que son capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y lograr establecerse y así proporcionar dicho beneficio.

Debido a los beneficios que potencialmente se pueden obtener como resultado de la manipulación de la microbiota intestinal en términos de prevención de algunas enfermedades gastrointestinales, la disminución o eliminación de algunas bacterias patógenas, o favoreciendo la respuesta del sistema inmunológico es de suma importancia el estudio de estos microorganismos, dentro de los más utilizados comúnmente encontramos a las bacterias ácido lácticas y a las bifidobacterias; sin embargo en la actualidad el uso de otros microorganismos como las levaduras no se descarta para su utilización como microorganismo probiótico.

Por otro lado existen alimentos resultantes del metabolismo de diversos microorganismos que son consumidos normalmente por la población, como por ejemplo el yogurt, el kéfir, el jocoque y el pulque, sobre todo este último en poblaciones de bajos recursos y que sin embargo se ha demostrado que presenta niveles considerables sustancias nutritivas. A este respecto es interesante saber que el pulque está compuesto por microorganismos que contribuyen a dicha composición. En este mismo sentido se ha aislado la levadura *Kluyveromyces marxianus* a partir del pulque encontrando algunas características probióticas. Sin embargo no se había definido su carácter probiótico. En el presente estudio se evaluó la capacidad probiótica de la levadura *Kluyveromyces marxianus* por medio de ensayos *in vitro* e *in vivo* para definir su capacidad probiótica y ser un microorganismos confiable para la alimentación humana.

II ANTECEDENTES

El estudio de los probióticos comienza cuando se empieza a investigar los efectos de las bacterias ácido lácticas descritas en 1857 por Pasteur. La base científica del concepto de probiótico surgió cuando Elie Metchnikoff postuló la relación entre los fermentos de la leche y la longevidad analizando la dependencia entre los microorganismos intestinales y los ingeridos (1), con esta premisa fue posible adoptar medidas para modificar la microbiota del intestino, e intentar sustituir microorganismos patógenos por microorganismos benéficos para la salud del huésped, estudios desarrollados en Rusia, Bulgaria y otras partes de Europa sobre la microbiología de la leche y el yogurt, describen organismos presentes y activos en el proceso natural de fermentación tales como *Lactobacillus delbrueckii bulgaris* (2). En 1911, Lorendon M. Douglas escribió sobre los *Bacillus* de larga vida, más adelante, en 1972, Freter (3) encontró que la especie *Bacillus bulgaricus* no sobrevivía a las condiciones del intestino, sin embargo encontró que la especie *Lactobacillus acidophilus* es capaz de sobrevivir e instalarse en dicho hábitat, en 1935 esta especie fue empleada en pacientes con trastornos intestinales obteniendo resultados benéficos.

Posteriormente Freter (3) realizó experimentos en modelos animales donde algunos antibióticos destruían la microbiota de ratones haciéndolos vulnerables a microorganismos patógenos como *Salmonella* y *Shigella*, la administración de *Lactobacillus casei* y algunas especies de *Bifidobacterium* demostraron que eran capaces de proteger a los ratones jóvenes de dichas infecciones, en la actualidad no solamente se utilizan bacterias con fines probióticos, incluso levaduras como *Saccharomyces boulardii* ha sido ampliamente estudiada para este propósito, esta levadura es utilizada en muchos países como agente preventivo y terapéutico para prevenir enfermedades gastrointestinales causados por la administración de antibióticos (4). A partir de 1960 se acuñó la palabra probiótico para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (5). Todos los estudios mencionados anteriormente sirvieron de base para que a partir de ellos surgieran nuevas alternativas al uso de probióticos.

2.3 MARCO TEÓRICO

2.3.1 Alimentos funcionales

En los últimos años, se han producido muchos avances en el campo de la nutrición debido a su expansión hacia diferentes áreas científicas como la inmunología, la microbiología y la genómica. La coordinación de estas disciplinas ha permitido profundizar en las bases que expliquen la relación que existe entre la dieta y el estado de salud atribuyéndole a la alimentación no solo el valor nutritivo sino también a los efectos benéficos derivados de las interacciones entre el huésped y la microbiota intestinal.

Sobre el mismo contexto surgen los alimentos funcionales que son aquellos que además de aportar los nutrientes necesarios van a ejercer beneficios sobre el organismo, promoviendo la salud y reduciendo los riesgos de enfermedad en el individuo que los consume (6). El primer país en introducir en el etiquetado de sus productos el término de alimentos funcionales fue Japón, y actualmente representa el 50% del mercado (7). Este concepto ha ido popularizándose y expandiéndose hacia otros continentes como Europa y América, fundamentalmente debido a la preocupación por la nutrición, dieta y salud de la sociedad actual, dentro de los alimentos funcionales más utilizados podemos encontrar los alimentos adicionados con alguna vitamina (B6, B12, D y K, ácido fólico) utilizados comúnmente en la elaboración de pan y cereales, los adicionados con algún mineral (calcio, magnesio y zinc), principalmente los encontrados en productos lácteos, con antioxidantes (vitamina C y E, carotenos, flavonoides, lipofenoles) los cuales se pueden adicionar principalmente a jugos y zumos de fruta, los que se les adicionan ácidos grasos como omega 3, alimentos adicionados con prebióticos como fructo-oligosacáridos, finalmente en esta categoría los probióticos constituyen un grupo importante dentro de los alimentos funcionales por los beneficios potenciales en la salud por lo que se ha incrementado la investigación en el desarrollo de estos productos.

2.3.1.1 Probióticos

La flora intestinal se adquiere durante el periodo neonatal y permanece relativamente estable el resto de la vida; aunque depende de diversos factores como el uso de antibióticos o la dieta y no es fácil modificarla de forma definitiva (8). La adición de ciertas bacterias permite el mantenimiento de un determinado tipo de flora.

El término probiótico se deriva del griego “pro” que significa a favor de y “bios” que significa vida, fue utilizado por primera vez por Lylli y Stilwell (5) en el año de 1965 para definir a las sustancias que estimulan el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, esta definición no persistió y fue subsecuentemente usado por Sperti en 1971(9) para describir extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento microbiano. No fue, sino hasta 1974 que Parker lo definió como: Organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (10). En 1989 Fuller redefinió los probióticos como suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta benéficamente al animal huésped mejorando su balance microbiano intestinal (11). En 1992, Havenaar y Huis In’t Veld consideraron a los probióticos como aquellos que al ser suministrados a animales o humanos, producen efectos benéficos en el hospedero por el incremento de las actividades de la microbiota nativa(12). Con base a los avances en este campo, Salminen y sus colaboradores (13) propusieron la definición apropiada: Los probióticos son preparaciones o componentes que de células microbianas que tienen un efecto benéfico en la salud del hospedero. Conjuntando las definiciones anteriores, Schrezenmeir y De Vrese (14) proponen la definición: Preparación de un producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimento del huésped provocando efectos beneficiosos sobre la salud del mismo, como la más acertada para el termino probiótico.

2.3.1.2 Beneficios inmunológicos de un probiótico

Los probióticos influyen sobre la composición de la flora intestinal y son capaces de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud (15). Entre los beneficios estudiados podemos encontrar los relacionados con aspectos inmunológicos.

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, ya que está en contacto con el exterior y recibe diariamente una enorme carga antigénica, distinguiendo entre potenciales patógenos y antígenos inocuos como las proteínas de la dieta y bacterias comensales. El principal componente del sistema inmunitario intestinal está constituido por el tejido linfoide asociado al intestino (16) ; dada su localización intestinal y la posibilidad de interactuar con el epitelio de la mucosa, es evidente que los probióticos actúan sobre la inmunidad intestinal tanto específica como inespecífica, y que este hecho está íntimamente relacionado con sus efectos beneficiosos sobre el huésped. Diversos estudios han puesto de manifiesto que numerosos lactobacilos pueden alertar al sistema inmune intestinal, por ejemplo el lactobacilo *Casei shirota* es utilizado como probiótico debido a que este estimula respuestas inmunológicas previniendo las infecciones por cepas de la familia *Enterobacteriaceae* (17), esto lo puede realizar mediante la producción de inmunoglobulinas específicas de tipo A (18) o la activación de células K (19). Otros efectos inmunomoduladores de algunos probióticos se derivan de su capacidad para incrementar la actividad fagocítica de leucocitos intestinales, promover una mayor proliferación de células B junto con aumento en la secreción de inmunoglobulinas (A y G), y estimular la producción de citosinas.

2.3.1.3 Beneficios de carácter no inmunológico

2.3.1.3.1 Refuerzo de la barrera gastrointestinal

Las bacterias que se encuentran en el intestino contribuyen a la adecuada permeabilidad de la mucosa intestinal. En ocasiones microorganismos perjudiciales incrementan dicha permeabilidad y favorecen el paso de bacterias y macromoléculas de la dieta a través de la mucosa (20). Existen microorganismos probióticos que tiene la capacidad de reparar ese daño (21, 22). Lo cual ha sido constatado en experimentos *in vitro* mediante estudios con líneas celulares e *in vivo* con la experimentación con animales (23) por ejemplo cepas como *Saccharomyces boulardii* puede mejorar los síntomas de la enfermedad de Chron y la colitis ulcerativa, así como el síndrome de colon irritable (24).

2.3.1.3.2 Mantenimiento de la flora intestinal normal

Las microbiota del ser humano está formada por una gran cantidad de microorganismos que han evolucionado en armonía con su huésped y mejorar su salud, además producen una gran variedad de sustancias como ácidos grasos, peróxidos y bacteriocinas que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. La microbiota intestinal participa en varios procesos fisiológicos como la digestión y la motilidad, además de funciones metabólicas del organismo tales como la producción de vitaminas, el consumo indiscriminado de antibióticos para tratar infecciones de origen microbiano afecta no solamente a microorganismos patógenos sino también a microorganismos autóctonos en el huésped (25). Además favorece la aparición de cepas resistentes y aumenta el riesgo de infecciones (26).

Los microorganismos probióticos ayudan a repoblar el intestino humano en los casos de alteración de la microflora propia como consecuencia de infecciones intestinales. El consumo de estos se recomienda en el tratamiento y prevención de la diarrea, enteritis o colitis (13, 20).

2.3.1.3.3 Uso y control en la intolerancia a la lactosa

La lactosa es el principal azúcar de la leche, siendo digerida por la enzima lactasa presente en el intestino delgado. La intolerancia a la lactosa es una situación en la que existe una deficiencia de esta enzima, lo que hace que este disacárido pase directamente al intestino grueso sin ser asimilado, en el intestino delgado se fermenta con ayuda de la flora intestinal y produce agua, ácidos grasos y gases, ocasionando síntomas como diarrea, dolor abdominal o distensión. Entre las causas que pueden generar intolerancia a la lactosa se incluyen alteraciones de la mucosa intestinal, infecciones por parásitos o bacterias, síndrome del intestino irritable, entre otros. La eficacia de los probióticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan a la intolerancia a la lactosa están dados por un incremento de la actividad lactasa en el intestino delgado por las bacterias productoras de ácido láctico (27) y por la fermentación de azúcares, principalmente lactosa, en ácidos orgánicos como el ácido láctico y el acético (28).

2.3.1.3.4 Reducción del colesterol

Elevados niveles sanguíneos de ciertos lípidos son un factor de riesgo para problemas cardiovasculares. Los mecanismos y efecto de las bacterias probióticas en la reducción del colesterol se desconocen actualmente. Una de las hipótesis sugiere que ciertas cepas probióticas por ejemplo *Lactobacillus acidophilus* tiene la capacidad de asimilar el colesterol, otro mecanismo propuesto se basa en la capacidad de esta cepa para desconjugar los ácidos biliares, atribuible a la capacidad 7-hidrolasa bacteriana. Eventualmente el aumento de las pérdidas de fecales de ácidos biliares conduciría a un aumento compensatorio de su síntesis hepática a partir del colesterol reduciendo así la colesterolemia (29). Belviso reporto la capacidad de cepas de *Lactobacillus* de incorporar a su membrana o adherir colesterol a su superficie, reduciendo la disponibilidad para su absorción intestinal y posterior pase a la sangre (30).

2.3.1.3.5 Valor nutritivo

Los alimentos que contiene microorganismos probióticos tienen un efecto favorecedor en el metabolismo de algunos nutrientes, incrementando el valor nutritivo de los alimentos. Las bacterias contenidas en los alimentos con capacidad probiótica pueden dar origen a otras sustancias que además de modular la flora gastrointestinal y de conducir a una metabolización diferente del sustrato, pueden intervenir específicamente en la producción de flora gastrointestinal, ejerciendo acciones específicas distintas (31).

2.3.1.3.6 Competencia con bacterias patógenas

Los probióticos son microorganismos sin capacidad patógena, capaces de prevenir la adherencia, establecimiento y replicación y/o la acción de las bacterias patógenas. Entre los posibles mecanismos moduladores se encuentra la disminución del pH en el lumen intestinal, debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, como el lactato y los ácidos grasos de cadena corta acetato, (propionato y butirato) consecuencia de su

capacidad fermentativa sobre la fibra que se consume (32-34). Otro mecanismo involucrado es la producción de compuestos antibacterianos como pueden ser bacteriocinas o peróxido de hidrogeno (35).

Tras evidencias han considerado el desplazamiento de bacterias nocivas no necesariamente es ocasionado por la actividad bacteriostática o bactericida, sino que puede ser consecuencia de la competencia física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles para las bacterias patógenas (36).

2.3.1.3.7 Efecto de los probióticos en distintas patologías

Teniendo en cuenta que la administración de los probióticos es por vía oral, es lógico el pensar que sus beneficios se manifestaran principalmente en patologías del sistema digestivo; sin embargo, la posibilidad de modular la respuesta inmune de tipo sistémica hace que los probióticos también puedan presentar efectos positivos en algunas otras alteraciones extraintestinales que se mencionan a continuación.

2.3.1.3.7.1 Diarrea

Síndrome caracterizado por el incremento en la frecuencia del peso y/o el contenido de agua en las heces, en general se trata de una respuesta inespecífica del intestino ante diferentes situaciones, incluyendo la presencia en el lumen intestinal de toxinas o microorganismos patógenos, falta de absorción de sustancias osmóticamente activas, consumo de fármacos, o lesiones en la mucosa intestinal (37). Entre los mecanismos por los que los probióticos podrían prevenir o aminorar la diarrea incluyen: Competición con virus o bacterias patógenas por sus sitios de unión a las células epiteliales (38) (39), inhibición del crecimiento de bacterias patógenas debido a la producción de bacteriocinas (40) , mejoramiento de los mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal, como pueden ser un posible aumento en la secreción de IgA, así como en la producción de moco (41, 42).

Entre los probióticos que han mostrado eficacia en estudios llevados a cabo en procesos diarreicos en humanos se incluyen a *Lactobacillus rhamnosus* GG (43), *Lactobacillus reuteri* (44), *Saccharomyces boulardii* (45) y *Bifidobacterium spp.* (44).

2.3.1.3.7.2 Cáncer

Existen evidencias que indican que los microorganismos probióticos pueden impedir o retrasar la aparición de ciertos tipos de cáncer principalmente los relacionados con el tracto gastrointestinal. Esto se deriva del conocimiento de que los elementos que constituyen la microbiota intestinal pueden producir sustancias carcinógenas como las nitrosaminas y por consiguiente, la administración de microorganismos probióticos podría teóricamente modificar la flora, dando lugar a una reducción de los niveles de β -glucuronidasa y sustancias carcinógenas (46). Hay algunos indicios de que la instalación intestinal de probióticos, por ejemplo *Lactobacillus casei* Shirota, puede reducir las reapariciones del cáncer en otros sitios, como la vejiga urinaria (47). Estudios *in vitro* con *Lactobacillus rhamnosus* GG y bifidobacterias y un estudio *in vivo* utilizando cepas GG y LC-705 de *Lactobacillus rhamnosus*, así como *Propionibacterium sp*, demostraron una disminución de la disponibilidad de aflatoxina carcinógena en el lumen (48, 49).

2.3.1.3.7.3 Enfermedad inflamatoria intestinal

Dentro del término de enfermedad inflamatoria intestinal se encuentran la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, ambas patologías se caracterizan por su evolución crónica y periodos de remisión y de exacerbación., la enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal pero es más frecuente en la región ileocecal (50) en donde la inflamación se propaga a través de toda la pared intestinal, originando la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas en órganos adyacentes (51); en cambio en la colitis ulcerosa se limita al colon, fundamentalmente en la región distal extendiéndose gradualmente a la región proximal donde la inflamación afecta principalmente a las capas superficiales de la pared intestinal, normalmente la mucosa y la submucosa

caracterizándose por la infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas (52). Para explicar el posible efecto antiinflamatorio intestinal de los probióticos se ha propuesto la participación de varios mecanismos, entre los que se incluyen: Competición con bacterias nocivas por el sitio de fijación al epitelio (53, 54), Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y/o producción de su muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o la reducción del pH y Modulación de la respuesta inmune de la mucosa del hospedador.

2.3.1.3.7.4 Alergias

Aunque se están estudiando los efectos preventivos y terapéuticos que ejercen los probióticos sobre estas patologías, hasta el momento los resultados son controvertidos y no se conocen con exactitud los mecanismos de acción por los que pueden actuar. Entre los mecanismos propuestos se incluyen; la intervención de los probióticos para ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias alimentarias mediante la modulación del sistema inmunológico a través de la modificación de la flora intestinal, (15) mejora de la función de barrera intestinal sugiriéndose que la utilización de probióticos puede producir una competencia por los sitios de unión de los potenciales alérgenos a los enterocitos. Este último mecanismo sugiere que aumenta el efecto barrera y produce una disminución en la inflamación intestinal local lo que resultaría un instrumento útil para tratamiento de alergias alimentarias (55).

2.3.1.4 Criterios para la evaluación de un microorganismo con capacidad probiótica

Cuando el microorganismo ya se ha obtenido, aislado, y se han realizado procesos de caracterización para obtener su identificación, es necesario realizar pruebas de capacidad probiótica *in vitro* e *in vivo*, que permitan evaluar la resistencia del microorganismo a condiciones características del tracto gastrointestinal. Esto se debe a que los probióticos deben seguir esas características para que cumplan su función y permitan una correlación entre ambas (56). El microorganismo debe cumplir además ciertas características, que

deberán ser consideradas al elaborar los criterios para la selección de nuevas cepas con potencial probiótico (57-61).

- a) Identificación de la cepa, es sumamente importante que exista una correcta identificación de las cepas utilizando pruebas bioquímicas o moleculares para su identificación, las propiedades probióticas dependen de la cepa, por lo que únicamente aquellas cepas que se encuentren identificadas se deben utilizar para este tipo de estudios.
- b) Puede o no ser de origen humano, esta condición se basa en que las cepas aisladas a partir de seres humanos probablemente carecen de patogenicidad y presentan una mayor facilidad para colonizar el intestino, sin embargo pueden utilizarse cepas de otros orígenes que no sea el ser humano.
- c) Bioseguridad, la ausencia de patogenicidad es considerado un requisito primordial para la caracterización de una cepa probiótica, se deben realizar pruebas que incluyan la ausencia de producción de sustancias tóxicas o dañinas.
- d) Tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, para que un microorganismo pueda ejercer algún beneficio en el huésped, es necesario que resista el pH gástrico, las enzimas digestivas, y la acción detergente de las sales biliares, sin embargo, esta resistencia no tiene que entenderse en términos absolutos; la ingestión de un número elevado de inóculo permite que una cantidad suficiente de microorganismos permanezca viable al llegar al intestino, aunque su número se vea reducido drásticamente.
- e) Adherencia al epitelio intestinal, aunque los microorganismos probióticos son ingeridos de manera exógena idealmente deberían colonizar el intestino de forma persistente, para lo cual es necesario que posean la capacidad de adherirse, sin embargo, si esta condición se aplicara de manera estricta, serían pocos los microorganismos clasificados como probióticos, cabe mencionar que

microorganismos exógenos pueden tener efecto benéfico a pesar de ser únicamente transitorios(62).

- f) Producción de antibiosis, la producción de sustancias antimicrobianas se considera uno de los mecanismos de acción por lo que los microorganismos probióticos suministran protección frente a los patógenos, esta antibiosis puede ser ejercida a través de mecanismos metabólicos generales como la producción de ácidos orgánicos o radicales oxidantes o por la producción de antibióticos.
- g) Capacidad para actuar como interfaz metabólico, uno de los mecanismos reconocidos de acción probiótica reside en la capacidad para actuar como una barrera metabólica que impida la llegada de agentes nocivos, así algunos microorganismos probióticos interfieren con la asimilación de colesterol, hidrolizan la lactosa o inactivan agentes cancerígenos, obviamente esta propiedad no se extiende como un requisito a todos los microorganismos con potencial probiótico.
- h) Modificación de la respuesta biológica, algunos de los efectos más importantes atribuidos a los microorganismos probióticos se ejercen a través de su actividad inmunomoduladora, tal es el caso de la protección frente a infecciones intestinales o extraintestinales, la inhibición de tumores ya establecidos, efectos antiinflamatorios y antialérgicos. A pesar de su importancia esta característica no debe considerarse como una condición absoluta, ya que puede ejercer beneficio mediante alguna de las otras vías.

2.3.1.5 Pruebas de capacidad probiótica in vitro

2.3.1.5.1 Tolerancia a sales biliares

La bilis es una solución verde acuosa que está compuesta principalmente por ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos y pigmentos, se sintetiza en los hepatocitos del hígado y se

almacena en la vesícula biliar; posteriormente se libera al duodeno después de la ingesta de comida. La bilis es un detergente biológico que solubiliza los ácidos grasos de cadena larga y los mono y diacilglicéridos resultantes de la acción de las lipasas intestinales, formando micelas y por lo tanto juegan un rol importante en la digestión de los lípidos (63). La resistencia a sales biliares es un parámetro importante para la selección de un probiótico. Una concentración de 0.15-0.3% de sales biliares ha sido recomendada para la selección de probióticos en uso humano debido a que son las concentraciones a las cuales son sometidos los alimentos en el tracto gastrointestinal en el ser humano (64). Para evaluar la tolerancia a sales biliares, se suplementa el medio de cultivo, según el tipo de microorganismo a evaluar, con diferentes concentraciones de sales biliares y se incuba por periodos de 24 horas, realizando determinaciones de viabilidad mediante turbidez o recuento de colonias (65).

2.3.1.5.2 Tolerancia al pH estomacal

Más de dos litros de jugo gástrico con un pH con valores que pueden abarcar de 1.5 a 2.5 son secretados a través de las células del estómago todos los días, proporcionando una efectiva barrera acida contra los microorganismos que ingresen al tracto gastrointestinal debido a esto el efecto del pH acido sobre la viabilidad de los microorganismos y la prevención de su colonización en el intestino ha sido estudiado (66). Por lo consiguiente cualquier microorganismo que se desee considerar como probiótico debe tener resistencia al pH del estómago se debe evaluar en ensayos típicos de resistencia al pH la viabilidad del candidato como microorganismo probiótico es la exposición en un medio de cultivo o solución amortiguadora con niveles de pH bajos por un periodo de tiempo, durante el cual se determina el número de microorganismos viables.

2.3.1.5.3 Resistencia a jugos gástricos

El jugo gástrico es producido en el estómago, es una sustancia muy ácida cuya función es degradar el alimento, se compone principalmente por agua, sales, ácido clorhídrico,

mucoproteínas, enzimas proteolíticas, factor intrínseco, secreciones endocrinas e inmunoglobulinas. Dentro de estas sustancias se destaca el ácido clorhídrico, que es secretado por las células gástricas parietales, que mantiene el pH necesario, ablanda la fibrina y el colágeno, controla el paso de los microorganismos al intestino y estimula la secreción de secretina así como la secreción pancreática y biliar. Contiene enzimas como la pepsina que en medio ácido indica la digestión de las proteínas, la evaluación *in vitro* se realiza elaborando un jugo gástrico artificial en donde los microorganismos a evaluar se incuban por periodos determinados para determinar su viabilidad mediante el recuento de colonias o la turbidez (67).

2.3.1.5.4 Adhesión celular

Los cultivos de tejidos celulares se han desarrollado con el objetivo de reproducir las condiciones *in vivo* que permitan el crecimiento de las células, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, biológicas, bioquímicas y la adherencia celular. Estudios sobre cultivos celulares son esenciales para la selección de nuevas cepas con potencial probiótico (68). La importancia de la adhesión del microorganismo que se pretende usar como probiótico a las células epiteliales del intestino ha sido demostrada en estudios clínicos, ya que el microorganismo debe hacerlo para lograr su establecimiento en el ecosistema del tracto gastrointestinal (69).

2.3.1.5.5 Cultivo celular en intestinos *in vitro*

Existen técnicas como el uso del intestino invertido para realizar pruebas *in vitro*, esta técnica se desarrolla principalmente para la farmacología en donde intestinos de rata o ratón eran utilizados por su semejanza con su equivalente en el humano (70), consiste en sacrificar a los animales mediante dislocación cervical y diseccionar los órganos, una vez obtenidos los intestinos, estos se lavan con una solución amortiguadora estéril, a partir de este momento los órganos pueden ser incubados según se requiera.

2.3.1.6 Pruebas de capacidad probiótica *in vivo*

El uso de modelos de experimentación animal resulta muy útil para evaluar *in vivo* la seguridad y los efectos de la administración de altas dosis, antes de desarrollar ensayos clínicos en humanos. En este sentido, se debe continuar avanzando en el desarrollo de mejores modelos de enfermedad. Existen diferentes especies de animales como ratas y ratones que son utilizados en la experimentación siendo el ratón el más utilizado en la mayor parte de las experiencias *in vivo* de biología y medicina, es en general el modelo elegido para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una agresión, intoxicación o una infección experimental (parasitaria, bacteriana o vírica) además se caracteriza por ser de tamaño pequeño, docilidad, bajo costo y una fácil manipulación siendo un excelente modelo que permite la investigación de los procesos que ocurren en el ambiente intestinal (71, 72).

2.3.1.7 Clasificación de microorganismos probióticos

La clasificación de los microorganismos probióticos incluye una amplia biodiversidad microbiana diversa tanto microorganismos eucariotes como procariotes pueden poseer capacidad probiótica. (73).

2.3.1.7.1 Probióticos procariotas

La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas, que comparten la propiedad de generar esta molécula como principal producto de su metabolismo fermentativo, miembros de este grupo, son bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y *Bifidobacterium*.

2.3.1.7.2 *Probióticos eucariotes*

Los microorganismos eucariotes pueden ser utilizados para el consumo animal y humano como probióticos, estos microorganismos han sido empleados como proteínas, sin embargo, algunos de ellos han sido adicionados en condiciones vivas a través de la dieta proporcionándole un beneficio al huésped. Existe un interés significativo en el campo de los probióticos para el desarrollo de nuevos candidatos de origen eucariota, su eficacia y uso han sido confirmados mediante evidencias científicas. Muchos de estos microorganismos son levaduras entre los cuales encontramos a *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Yarrowia* y *Debaryomyces*. Las levaduras han sido utilizadas hoy en día son parte de suplementos alimenticios establecidos como probióticos, especialmente el género *Saccharomyces* es ampliamente utilizado como probiótico en el humano y en los animales (74, 75).

2.3.1.7.2.1 *Propiedades de los microorganismos eucariotas utilizados como probióticos*

Algunos microorganismos eucariotas presentan características ideales para ser considerados un microorganismo probiótico, algunas de las características que los destacan son su mayor tamaño, diversidad morfológica, flexibilidad nutricional, tolerancia a condiciones de estrés como el bajo pH, oxígeno y agua, alta presión osmótica, la secreción de algunas enzimas, propiedades antioxidantes, antimicrobianas, y la utilización de algunos metabolitos. Estas características no solo contribuyen a su habilidad de resistir el tracto gastrointestinal del hospedero, además le pueden proporcionar un efecto benéfico. Las levaduras pueden resistir un rango amplio de temperaturas y concentraciones de sales y pH dependiendo de la especie, la temperatura puede afectar su metabolismo, generalmente crecen mejor en una temperatura de entre 20 a 37°C siendo su límite 50°C aproximadamente (76).

2.3.1.7.2.2 Fuentes de probióticos eucariotas

El aislamiento y la identificación de probióticos eucariontes de fuentes naturales garantizan consideraciones especiales, existe un gran interés en el desarrollo de probióticos de este tipo en general de levaduras para uso humano y animal, estas pueden ser aisladas de plantas, animales, suelo, agua y en la atmosfera, también son asociadas con la piel y el tracto gastrointestinal del humano y animales (77-79). Las levaduras se asocian principalmente a muchos alimentos principalmente lácteos (74), la literatura sugiere que los productos lácteos pueden actuar como buenas fuentes de microorganismos probioticos como *Candida* (*C. humilis*), *Debaryomyces* (*D. hansenii*, *D. occidentalis*), *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. lodderae*, *K. marxianus*), *Yarrowia* (*Y. lipolytica*) y algunas otras especies (56, 80, 81).

2.3.1.7.2.2.1 Levaduras como microorganismos con capacidad probiótica

La levaduras son organismos unicelulares importantes en el sector biotecnológico e industrial, son esenciales en la producción de algunos alimento, bebidas y también pueden estar involucradas en la degradación de algunos alimentos por procesos de fermentación o incluso como contaminantes (82). Las levaduras son microorganismos que se encuentran clasificados dentro de los ascomicetos y basidiomicetos.

En general la mayoría de las levaduras está comprendida entre 35 y 37°C y el valor óptimo de crecimiento es a los 28° C; sin embargo estas temperaturas no son rigurosamente las óptimas para todas las levaduras cuando se encuentran en ambientes naturales. De modo general no son considerados como organismos termofílicos, sin embargo, la termodestrucción comienza desde los 52° C, siendo las células en la fase exponencial más sensibles que las de fase estacionaria (83).

La mayor parte de las levaduras comúnmente encontradas crecen mejor en medios que disponen de gran cantidad de agua, algunas son osmotolerantes y soportan la actividad del agua; sin embargo, el efecto de la presión osmótica varía de una cepa a otra y su mecanismo de resistencia en medios con actividad de agua baja se explica por la

acumulación en la célula de polioles para minimizar la presión osmótica entre la célula y el medio (83).

Comúnmente, las levaduras pueden ofrecer un gran potencial como microorganismos probióticos, incluyendo su mayor tamaño, su diversidad morfológica, su nutrición, su habilidad para tolerar condiciones de estrés (bajo pH, agua, oxígeno y presión osmótica), la secreción de enzimas y su habilidad para producir diferentes metabolitos (84). Estas características no solo contribuyen a su habilidad para resistir el tránsito gastrointestinal del huésped, sino que también son indispensables para proporcionarle un beneficio. Sin embargo las propiedades biológicas específicas de cada levadura va a depender considerablemente del tipo de la cepa de estudio (85).

2.3.2 *El pulque como alimento probiótico*

El pulque es una bebida mexicana tradicional que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenida a partir de diferentes especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*). Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente, en las áreas de la meseta central. El pulque se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y viscosa (86).

Dentro del pulque, así como de muchas bebidas fermentadas, los consorcios de microorganismos son comúnmente encontrados y se considera que la interacción entre ellos favorece a los microorganismos en cuanto a la captación de nutrientes (87). La literatura reporta que a partir del pulque se pueden aislar diversos grupos de microorganismos como *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*, proteobacteria y hongos levaduriformes (88).

El pulque puede actuar como probiótico, de manera semejante a ciertos productos industrializados que contienen lactobacilos o levaduras activos que permiten interactuar con la microbiota del intestino (89). Diversos microorganismos en el pulque como bacterias ácido lácteas homofermentativas, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus mesenteroides*,

Lactobacillus kimchi, *Lactobacillus acidophilus* siendo esta última reportada con capacidad probiótica y utilizada para la elaboración de productos comerciales (90).

En la actualidad no existen un reporte completo acerca de la identificación completa de los microorganismos del pulque por lo que especies que no han sido identificadas pueden conferirle al pulque el carácter de bebida con capacidad probiótica.

2.3.2.1 Consumo de pulque

En la actualidad, el pulque aún es consumido principalmente en poblaciones indígenas y mestizos del Valle del Mezquital, no solamente como bebida alcohólica, sino también como alimento complementario en su alimentación ya sea en forma directa o como ingrediente en salsas, bebidas y mezclas; incluso en muchas ocasiones como sustituto de café, té, e incluso de la leche ya que es utilizado en repetidas ocasiones como primer alimento después del termino de ablactación en los niños (91).

2.3.2.2 El pulque como aporte nutritivo

A través de estudios se ha demostrado que el pulque contiene sustancias nutritivas útiles al ser humano como el hierro, altos niveles de triptófano, azúcares, proteínas y vitaminas principalmente hidrosolubles(92, 93), de forma más precisa por cada 330 g contiene 20.1 g de hidratos de carbono y 11.6 g de etanol, es una fuente de energía ya que por cada 330 mL aporta 142 Kcal (93) contribuyendo con el 10% de tiamina, 24% de riboflavina, 23% de niacina, 48% de ácido ascórbico y 26% de hierro en la dieta del otomí (94).

Cervantes (95) reporta que por cada 100 mL de pulque hay 0.37 g de proteínas, 11 mg de calcio, 6 mg de fósforo, 0.70 mg de hierro, 0.02 mg de tiamina, 0.03 mg de rivo flavina, 0.35 mg de niacina, 5.10 mg de ácido ascórbico, 0.01 mg de ácido fólico y 0.08 g de hidratos de carbono.

2.3.2.4 El pulque como bebida intoxicante

A pesar de ser una bebida de bajo contenido alcohólico, existen datos que asocian el consumo del pulque con muertes por cirrosis hepática, sobretodo en la zona central de nuestro país. En Hidalgo, las muertes reportadas a causa de la cirrosis hepática son de 48 por cada 100,000 habitantes; pero se conoce que en el Valle del Mezquital, que es la zona donde mayoritariamente se observa el consumo del pulque, los casos se elevan a 140 muertes por cada 100,000 habitantes, desconociéndose el número de los casos debidos al consumo de pulque (96).

Por otra parte, algunas investigaciones demuestran el impacto negativo del consumo de pulque por parte de mujeres embarazadas sobre el peso de los recién nacidos (97).

2.3.2.5 Microorganismos aislados del pulque

La microbiología del pulque ha sido estudiada tanto por métodos tradicionales (98) como por métodos más precisos, como los reportados por Escalante y cols. (88) donde mencionan que los estudios de microbiología se han enfocado más en el aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en el aguamiel. Este grupo estudió tres muestras de aguamiel empleando técnicas de biología molecular como la amplificación de genes 16S rRNA por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y análisis de secuencias. Así fueron identificadas por primera vez *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus strain ASF 360*, *Lactobacillus Kefir*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Glucnobacter oxydans* y *Hafnia Alves*. También reportan que las bacterias dominantes fueron Gram positivas, en específico la especie *Lactobacillus* con un 80.97% en las tres diferentes muestras. De acuerdo a lo reportado por Herrera (89), las levaduras que mayormente se presentan en el pulque son *Saccharomyces cerevisiae*, así mismo se encuentran especies de géneros como *Cándida*, *Kloeckera*, *Rhodoturola* y *Toryloopsis*; en cuanto a bacterias las más abundantes son *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum*, además de *Zimomonas mobilis*.

Algunos de los microorganismos que intervienen en la fermentación del pulque son *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, responsables de la viscosidad característica produciendo polisacáridos del tipo de las dextranas; a bacterias como *Zymomonas mobilis* y levaduras del tipo de *Saccharomyces caribaji* y *Saccharomyces cerevisiae* se les atribuye la fermentación alcohólica transformando la glucosa en alcohol y dióxido de carbono liberando ácido láctico (99, 100).

Estudios reportan poblaciones microbianas en ordenes de 45×10^8 UFC/mL para *Saccharomyces sp*, 41×10^7 UFC/mL para *Zymomonas sp* y 34×10^6 UFC/mL para *Lactobacillus sp*, que le dan a la bebida un elevado valor nutricional y los microorganismos aislados podrían tener efecto benéfico al sistema digestivo al ser consumidos por vía oral (95).

2.3.3 *Kluyveromyces marxianus*

La levadura *Kluyveromyces marxianus* pertenece al género fue descrita por primera vez en 1888 por E. C. Hansen, y fue llamada *Saccharomyces marxianus*, se ha aislado a partir de las uvas, sin embargo también puede aislarse a partir de bebidas fermentadas como el kéfir y el pulque (101) así como otros alimentos como el queso, el yogur, la leche y fermentaciones espontaneas (102). A partir del año de la década de los setenta numerosos estudios se han realizado con la finalidad de conocer los aspectos metabólicos y bioquímicos de la levadura; dentro de algunas de sus características podemos encontrar que puede crecer en una gran variedad de sustratos y a altas temperaturas que oscilan entre 20° C hasta 39°C, un pH óptimo de entre 6 y 7. En la industria se ha empleado en el procesamiento de lactosuero, fermenta galactosa, sacarosa, rafinosa y lactosa y se ha utilizado en la producción de etanol teniendo una menor tendencia a producirlo cuando se encuentra en presencia de un exceso de azúcares (101). Otra de sus características es que es capaz de producir compuestos aromáticos como ésteres, ácidos carboxílicos, alcoholes, y acetato. Esta levadura también se utiliza para producir proteína unicelular a partir del suero de leche (74), en su caracterización microscópica presenta una forma circular como se muestra en la figura 1.

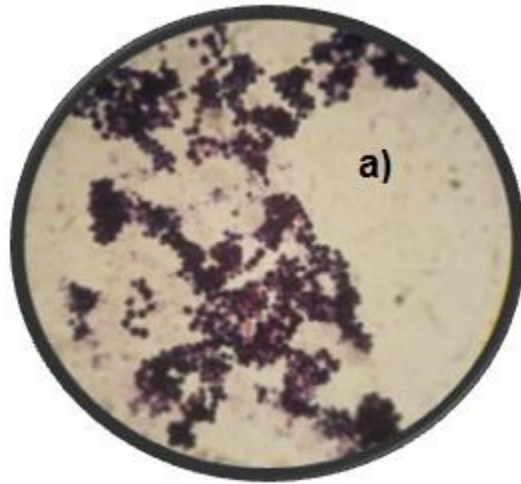


Fig. 1. Observación microscópica de la levadura *K. marxianus* colonias teñidas en color azul intenso a un campo de 100X

III. JUSTIFICACIÓN

El cambio continuo en el estilo de vida de hoy en día sumado a los efectos secundarios de las terapias con antibióticos, el incremento de enfermedades gastrointestinales por factores como una mala alimentación y estrés, ha generado interés a profundizar en el estudio de medios y procesos que permitan mejorar la calidad de vida del ser humano. Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica en nuestro país y en el mundo (103). Es por ello que se les considera un problema de salud pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social. En el 2008 el sistema gubernamental de salud brindó 2 millones 188 mil consultas relacionadas con desordenes gastrointestinales en nuestro país (103), es evidente que la mejor manera de prevenir ciertas enfermedades, como por ejemplo de carácter crónico degenerativas, consiste en mantener una dieta saludable y practicar ejercicio, el problema es que el estilo de vida predominante en nuestra sociedad actual hace complicado cuidar de nuestra alimentación, lo que provoca el abandono de ciertos hábitos nutricionales, esta situación ha provocado el aumento considerable de la demanda de nuevos alimentos funcionales destacando dentro de ellos a los probióticos, estos han mostrado tener un efecto benéfico en la reducción de las enfermedades de tipo gastrointestinal interviniendo directamente en la reducción de problemas como intolerancia a la lactosa e incluso están relacionados con la estimulación del sistema inmunológico, también algunas otras enfermedades como diarrea, enterocolitis, colitis ulcerosa y estreñimiento por mencionar algunas. Los microorganismos probióticos más utilizados son principalmente lactobacilos y bifidobacterias sin embargo últimamente el estudio de levaduras últimamente va en aumento debido a que tienen algunas ventajas como la resistencia a altas temperaturas, al estrés, actividad antimicrobiana y la producción de sustancias nutritivas, siguiendo el objetivo de introducir nuevas opciones en cuanto a microorganismos probióticos, en una investigación previa a partir del pulque se aisló la levadura *K. marxianus*, la cual se ha encontrado en otros alimentos fermentados como el kéfir y los búlgaros. En México el pulque ha sido reconocida como una bebida saludable desde hace siglos, sin embargo la producción de pulque ha disminuido rápidamente en los últimos años, en la actualidad no existe un producto que utilice con tecnología microbiana cultivos derivados del pulque como

probióticos, por lo que la mayoría de las cepas probióticas que se utilizan en la elaboración de alimentos funcionales son importadas lo que aumenta el costo de producción y elaboración. El estudio de la levadura *K. marxianus* tiene como finalidad el caracterizarla como microorganismo con potencial probiótico y al ser aislada a partir de una bebida de bajo costo y popular entre la población de recursos limitados como es el pulque su producción podría ser casera y de bajo costo pudiendo beneficiar a la población que lo consume, o bien adicionarla a otros productos de la industria alimentaria como jugos, bebidas lácteas y jugos, pudiendo tener un impacto en la nutrición de la población mexicana y al mismo tiempo disminuir algunos de los padecimientos gastrointestinales, por lo tanto reduciendo el costo del gasto de salud actual en cuanto a desórdenes gastrointestinales en nuestro país.

IV. HIPÓTESIS

Si la levadura *K. marxianus* es un microorganismo con capacidad probiótica entonces será capaz de adaptarse al tracto digestivo del huésped y proporcionar un beneficio.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterizar y evaluar la capacidad probiótica de la levadura *K. marxianus* mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la resistencia de la levadura *K. marxianus* a condiciones de pH ácido, sales biliares y jugo gástrico por medio de análisis de sobrevivencia en cultivos axénicos.
- Evaluar la capacidad de colonización de *K. marxianus* en el intestino grueso y delgado de ratones de la cepa CD-1
- Determinar el efecto que ejerce *K. marxianus* sobre la sobrevivencia de bacterias patógenas, mediante un ensayo de competencia.

VI. MATERIAL Y METODO

6.1 Obtención y conservación de la cepa de K. marxianus

La levadura *K. marxianus* fue aislada en una investigación previa a partir de muestra de pulque obtenida del municipio de Mineral de la Reforma, Hidalgo. Dicha muestra fue identificada mediante pruebas bioquímicas con ayuda del kit Api 20C A. x, y mediante la técnica de PCR para su identificación molecular, posteriormente a su identificación la cepa fue conservada en placas de Petri que contenían agar YPG, incubadas a 37°C, así como en caldo YPD incubadas a la misma temperatura a 150 r.p.m. una vez finalizado el periodo de incubación la cepa se mantuvo en refrigeración a 4°C y se realizaron siembras periódicas para mantenerla viable cada dos semanas aproximadamente.

6.2 Determinación de la capacidad probiótica de levadura K. marxianus mediante ensayos in vitro

Obtención del inóculo.

La cepa de *K. marxianus* se obtuvo a partir de una placa de Petri con agar YPG previamente incubada durante 24 horas a 37° C, posteriormente con ayuda de una asa bacteriológica se tomó una de las colonias y se inoculó en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo YPD bajo las siguientes condiciones 37° C, 150 rpm durante 24 hrs. Una vez finalizado el periodo de incubación empleando un espectrofotómetro (Marca Jenway 6305) se ajustó la absorbancia hasta obtener un valor de 620nm a una longitud de onda de 0,80, que corresponde a 1×10^8 UFC/mL de levaduras, debido a que esta es la cantidad de microorganismos que se utilizan en la preparación de alimentos comerciales adicionados con microorganismos probióticos (104).

6.2.1 Prueba de resistencia a sales biliares

Caldos YPG (Marca Sigma) que contenían a la levadura fueron suplementados con Bile Oxgal (Difco) hasta obtener concentraciones finales de 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30% respectivamente. Posteriormente, los medios fueron esterilizados a 121° C durante 15 min (67), a partir de esto se procedió a realizar el estudio

Un volumen de 1.0 mL del inóculo previamente preparado como se explica anteriormente que contenía 1×10^8 ufc/mL de levaduras fue inoculado en 9 mL de caldo YPG suplementado con cada una de las diferentes concentraciones de sales biliares anteriormente mencionadas y posteriormente fueron incubados a 37° C por 24 hrs.

Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron conteos en placa de la siguiente manera: De cada caldo YPG adicionado con las diferentes concentraciones de sales biliares se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0.85%(p/v). Las diluciones fueron sembradas en Agar YPD (Sigma), por el método de microgota. Para lo cual se tomaron 20 µl de cada muestra, depositándolos a una altura no mayor de 2 cm, extendiendo con triangulo bacteriológico, dividiendo la caja en cuatro cuadrantes y sembrando en cada uno dos réplicas de las diluciones realizadas, posteriormente se incubaron a 37° C por 24 hrs. Después de la incubación se escogieron las placas que tenían entre 10 y 20 colonias aisladas. Finalmente el número de colonias obtenidas fue multiplicado por el factor de corrección (50) para completar el recuento al mililitro y por el factor de dilución empleado. El recuento se reportó en UFC/mL (105).

6.2.2 Estabilidad de la levadura al pH del estómago

Al caldo YPG preparado se le adicionó HCL sin diluir para ajustar el pH a las siguientes concentraciones: 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0. Posteriormente fueron esterilizados a 121° C por 15 min.

Un volumen de 1.0 mL del inóculo previamente preparado como se explica anteriormente que contenía 1×10^8 UFC/mL de levaduras fue inoculado en 9 mL de caldo YPG con el pH ajustado a las concentraciones anteriormente mencionadas y se dejó incubar a 37° C por 24 hrs.

Finalizando el periodo de incubación, se realizaron recuentos de placa de la siguiente manera: de cada caldo YPG adicionado con las diferentes concentraciones de pH se realizaron diluciones seriadas en solución salina al 0.85% (p/v) y se sembraron por el método de microgota y fueron contabilizadas por el método previamente descrito.

6.2.3 Resistencia a jugo gástrico

Para hacer semejantes las condiciones del jugo gástrico se tomó 0.2 g de NaCl y 0.32 g de pepsina los cuales se disolvieron en un volumen de 80 ml de agua destilada. El pH se ajustó a 1.5 con HCL sin diluir y se completó el volumen a 100 ml totales con agua destilada estéril. Como control se ajustó jugo gástrico a un pH de 6.5 con NaOH 5N y se esterilizó por filtración con filtros de membrana de 22 μ m (67).

Posteriormente se inoculó 1 mL del inóculo que contenía a la levadura en 9 mL del jugo gástrico artificial a pH 1.5 y 7.0 (control) y se incubaron a 37° C tomando muestras de 20 μ L a las 0, 1, 2, 3, 4 y 24 hrs para observar la viabilidad celular (67).

De cada una de las muestras tomadas a cada hora, fueron sembradas y cuantificadas por la misma técnica descrita anteriormente.

6.2.4 Prueba de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en presencia de la levadura *K. marxianus* en un ensayo in vitro.

Tanto la cepa de *Escherichia coli* como la de *Klebsiella pneumoniae*, se obtuvieron del Hospital General de Pachuca Hidalgo, *Escherichia coli* se mantuvo en placas con Agar EMB (Eosina y Azul de Metileno) Sigma y la cepa de *Klebsiella pneumoniae* se conservó en placas con Agar Mac Conkey marca Sigma, de ambas cepas se realizaron resiembras periódicas para evitar su contaminación.

Para el ensayo de inhibición, a partir una placa de Agar EMB que contenía la cepa de *Escherichia coli* y otra que contenía *Klebsiella pneumoniae* en Agar Mac Conkey se tomó una muestra de las colonias de cada caja de petri y se inocularon en 50 mL de caldo Trypticaseína de Soya por separado y se incubaron a 37°C por 24 hrs, por otro lado a partir de una placa de Agar YPD que contenía a la levadura *K. marxianus* se tomó una muestra de una de las colonias, se inoculo en 50 mL de agar YPG y se incubó a 37°C por 24 hrs, una vez finalizados los tiempos de incubación, se realizaron modificaciones a la tecnica de Vanegas (106) de gota en doble capa de agar, se dispersaron 10 mL de Agar YPD en placas Petri, una vez solidificado se sembraron por goteo sobre la superficie 50 µL de *K. marxianus* con un recuento de 1×10^8 levaduras, realizando dos inóculos en la placa, se dejaron secar las gotas por 3 hrs en ambiente estéril y se incubaron a 37°C por 24 hrs, una vez finalizado el tiempo de incubación se preparó 40 mL de Agar Trypticaseína de Soya y se inocularon dos muestras de 1 mL que contenía 1×10^8 de *Escherichia coli* y otra que contenía la cepa de *Klebsiella pneumoniae*, se vertieron sobre la placas que contenían el crecimiento de las levaduras y se incubó a 37°C por 24hrs, una vez finalizado el periodo de incubación se observó si existía un halo de inhibición de crecimiento de ambas cepas patógenas. Posteriormente se tomaron muestras al azar de cada uno de los pozos y se realizaron tinciones de Gram para observar al microscopio la morfología de cada cepa.

6.3 Determinación de la capacidad probiótica de levadura *K. marxianus* mediante ensayos *in vivo*

6.3.1 Curva de Crecimiento de la levadura *K. marxianus*

Con la finalidad de conocer el número de levaduras que se utilizarían en la inoculación en experimentos posteriores se realizó una curva de crecimiento para comparar de acuerdo a la absorbancia las unidades formadoras de colonias, y conocer con exactitud la cantidad de levaduras que se inocularon, para esto en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 mL de caldo YPG se inoculo una muestra de la levadura *K. marxianus*, obtenida a partir de una caja de Petri con agar YPD previamente incubado a 37° C por 24 hrs. a 150 RPM, se

tomaron muestras cada 3 horas y posteriormente se midieron con un espectrofotómetro a una absorbancia de 620 nm, en cada una de las mediciones se realizaron diluciones seriadas para posteriormente sembrarlas en cajas que contenían Agar YPD, se incubaron durante 24 hrs. a 37° C, al finalizar este periodo de incubación se realizó el conteo de las colonias y se reportó como UFC/mL.

6.3.2 Establecimiento de la levadura K. marxianus en intestino grueso y delgado en un modelo de ratones CD-1

Para realizar este experimento se ocuparon cinco ratones hembra de aproximadamente 6-8 semanas de edad cepa CD-1 proporcionados por el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los animales fueron almacenados bajo condiciones de temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) con un ciclo de 12 hrs de luz/obscuridad con dieta estándar y agua libre.

Los animales fueron sacrificados por dislocamiento cervical y se procedió a la extracción del intestino grueso e intestino delgado en condiciones de esterilidad, los órganos de cada uno de los animales fueron dispuestos en una caja Petri estéril con 1 mL de solución salina estéril, con ayuda de un bisturí se realizó una incisión para mantener los intestinos con la mucosa interior expuesta, estos fueron lavados con solución salina estéril para eliminar el contenido intestinal y una vez que los órganos estuvieron libres de dicho contenido se inoculó un volumen de 200 μL que contenía 1×10^8 de levaduras resuspendidas en solución salina estéril. Para evitar que los órganos se secaran se colocó un volumen total de 3 mL de solución salina estéril hasta cubrirlo completamente y se incubaron a 37°C por 24 hrs. Una vez finalizado el tiempo de incubación se realizó un nuevo lavado del órgano cuidando en no rasgar las paredes de los intestinos, se colocaron en cajas Petri estériles a las cuales se les añadió un volumen de 3 mL de solución salina estéril y se incubaron a 37°C por 24 hrs, posteriormente a la incubación con ayuda de un asa bacteriológica se rasparon las paredes del órgano y el contenido se resuspendió en 1 mL de solución salina estéril el cual fue sembrado en placas con Agar YPD y se incubó a 37°C por 24 hrs, al finalizar el tiempo de incubación se tomaron colonias aleatoriamente y para realizar una tinción de Gram y

observarse en el microscopio, los resultados fueron reportados positivos para la presencia y negativo para la ausencia de levaduras después de la observación al microscopio.

*6.3.3 Cinética de colonización de la levadura *K. marxianus* en un modelo de ratones CD-1*

Para realizar este experimento se ocuparon cinco ratones hembra de aproximadamente 6-8 semanas de edad cepa CD-1 proporcionados por el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los animales fueron almacenados en condiciones de temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) con un ciclo de 12 hrs de luz/obscuridad con dieta estándar y agua libre.

El ensayo de colonización consistió en la administración de una dosis de 1×10^8 de levaduras en un volumen de 200 μL de vehículo por ratón, como vehículo se utilizó solución salina estéril y la inoculación se llevó a cabo por vía intraesofágica empleando una cánula de alimentación de acero inoxidable conectada a una jeringa estéril de 1 mL.

Los animales fueron sacrificados por dislocamiento cervical a tiempos determinados iniciando a partir de las 24 hrs de la inoculación con las levaduras y posteriormente a las 48, 72, 96, 120 hrs, antes de cada sacrificio se recolectaron las heces y se resuspendieron en 1 mL de solución salina estéril, se procedió a la extracción del intestino grueso e intestino delgado en condiciones de esterilidad, los órganos se colocaron en el interior de placas de Petri estériles, estas placas contenían 1 mL de solución salina estéril, con ayuda de un bisturí se realizó una incisión en los órganos para obtener la mucosa de los intestinos expuesta y con un asa bacteriológica se raspo el contenido intestinal y se resuspendió en la solución salina contenida en la placa Petri, posteriormente se tomó 1 mL de la solución salina con el contenido intestinal y se sembró en una placa con Agar YPD y se incubó a 37°C por 24 hrs, una vez finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias reportándose como UFC/mL y se tomaron muestras aleatorias sobre un portaobjetos, se realizó una tinción de Gram para la observación en el microscopio, reportando la presencia o ausencia de las levaduras identificadas por morfología. Paralelamente las heces recolectadas antes del sacrificio fueron resuspendidas en 1 mL de solución salina estéril posteriormente un mL de la suspensión fue sembrada en placas de Agar YPD y fueron incubadas a 37°C por 24 hrs, finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de las

colonias y se tomaron muestras aleatorias sobre un portaobjetos, se realizó la tinción de Gram y la observación en el microscopio reportando la presencia o ausencia de levaduras.

*6.3.4 Cinética de colonización de la levadura *K. marxianus* en un modelo de ratones CD-1 tras la administración de la levadura durante 7 días de incubación.*

Para realizar este experimento de colonización se ocuparon cinco ratones hembra de aproximadamente 6-8 semanas de edad cepa CD-1 proporcionados por el Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los animales fueron almacenados en condiciones de temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) con un ciclo de 12 hrs de luz/obscuridad con dieta estándar y agua libre.

El ensayo de colonización consistió en la administración de una dosis de 1×10^8 de levaduras en un volumen de 200 μL de vehículo por ratón, como vehículo se utilizó solución salina estéril y la inoculación se llevó a cabo por vía intraesofágica empleando una cánula de alimentación de acero inoxidable conectada a una jeringa estéril de 1 mL durante 7 días. A partir del día número 8 se procedió al sacrificio de los animales, por dislocamiento cervical, sacrificándose posteriormente hasta finalizar el día 12. Antes de cada sacrificio se recolectaron las heces y se procedió a la extracción del intestino grueso e intestino delgado en condiciones de esterilidad, los órganos se dispusieron en el interior de placas Petri estériles, las placas contenían 1 mL de solución salina estéril y con ayuda de un bisturí se realizó una incisión en los órganos para obtener la mucosa de los intestinos expuesta y con un asa bacteriológica se raspo el contenido intestinal y se resuspendió en la solución salina contenida en la placa Petri, posteriormente se tomó 1 mL de la solución salina con el contenido intestinal y se sembró en una placa con Agar YPD y se incubó a 37°C por 24 hrs, una vez finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias reportándose como UFC/mL y se tomaron muestras aleatorias sobre un portaobjetos, se realizó una tinción de Gram para la observación en el microscopio, reportando la presencia o ausencia de las levaduras identificadas por morfología. Paralelamente las heces recolectadas antes del sacrificio fueron resuspendidas en 1 mL de solución salina estéril posteriormente un mL de la suspensión fue sembrada en placas de Agar YPD y fueron incubadas a 37°C por 24 hrs, finalizado el tiempo de incubación se realizó el conteo de las

colonias y se tomaron muestras aleatorias sobre un portaobjetos, se realizó la tinción de Gram y la observación en el microscopio reportando la presencia o ausencia de levaduras.

6.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico los resultados fueron analizados mediante la prueba de ANOVA seguida de un post test de Tamhane utilizando el software estadístico SPSS con un valor de $P < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Determinación de la capacidad probiótica de levadura *K. marxianus* mediante ensayos *in vitro*

7.1.1 Tolerancia a sales biliares

Con la finalidad de comprobar la resistencia de la levadura a las sales biliares, se realizó un ensayo exponiendo a *K. marxianus* a diferentes concentraciones de sales biliares, los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia se muestran en la tabla 1. Se puede observar que la levadura fue capaz de crecer en todas las concentraciones de sales biliares a las que fue sometida desde 0.05% hasta 0.30% (p/v). Se observó que la cantidad de UFC de las levaduras en todos los casos se mantiene en el orden de 1×10^6 , esto indica que es tolerante a cada una de las concentraciones ensayadas de sales biliares, de acuerdo al análisis estadístico se observó que a partir de la concentración de 0.25% presentó diferencias significativas positivas con respecto a la concentración menor evaluada de 0.05%, manteniéndose en el mismo orden de 1×10^6 .

Tabla 1. Resultados de la tolerancia a sales biliares

Concentración de Sales Biliares	<i>K.s marxianus</i>
(% p/v)	UFC/mL
0.05%	6.6×10^6
0.10%	7.3×10^6
0.15%	6.5×10^6
0.20%	5.9×10^6
0.25%	7.9×10^6 *
0.30%	5.3×10^6 *

*El símbolo indica un valor de $P < 0.05$ según la prueba de ANOVA con post test de Tamhane.

7.1.2 Estabilidad al pH estomacal

La estabilidad de la levadura en diferentes concentraciones de pH se muestran en la Tabla 2 donde se puede observar que la levadura *K. marxianus* es capaz de crecer en todos los valores de pH estudiados, así mismo también se comprobó una diferencia significativa en el crecimiento conforme el medio se acidificaba más, sin embargo, en ningún momento se inhibe completamente su crecimiento por lo que la levadura es capaz de crecer en un pH ácido hasta de 1.5.

Tabla 2 Resultados de la prueba de estabilidad de pH estomacal.

Valor	<i>K. marxianus</i>
pH	UFC/mL
1.5	1.1×10^3 *
2.0	3.2×10^4 *
2.5	4.1×10^4 *
3.0	4.6×10^5 *
3.5	5.1×10^5 *
4.0	3.1×10^6 *

*El símbolo indica un valor de $P < 0.05$ según la prueba de ANOVA con post test de Tamhane.

7.1.3 Tolerancia al jugo gástrico

Los resultados correspondientes a la prueba de tolerancia al jugo gástrico que se realizó con la finalidad de comprobar si la levadura *K. marxianus* era capaz de sobrevivir a un jugo gástrico artificial se muestran en la tabla 3 donde se observó que existe una diferencia significativa de crecimiento en el jugo gástrico ajustado a pH de 1.5 disminuyendo las UFC cuando el medio se acidifica más, sin embargo no se inhibe por completo el crecimiento, en el pH de 7.0 que se utilizó como control las diferencias significativas en el crecimiento se presentan a partir de la hora 3 aumentando su crecimiento a la hora 24.

Tabla 3 Resultados de la prueba de resistencia de jugo gástrico con pH de 1.5 y 7.0

Muestreo	<i>K. marxianus</i>	
Horas	Jugo gástrico pH 1.5	Jugo gástrico pH 7.0
0	2.3×10^6 *	2.9×10^6
1	3.4×10^6 *	3.0×10^6
2	7.1×10^5 *	3.2×10^6
3	5.1×10^4 *	4.1×10^6 *
4	1.1×10^4 *	4.9×10^6 *
24	1.6×10^3 *	6.3×10^8 *

*El símbolo indica un valor de $P < 0.05$ según la prueba de ANOVA con post test de Tamhane.

7.1.4 Curva de crecimiento de la levadura *K. marxianus*

Con la finalidad de conocer con exactitud el número de UFC/mL se realizó una curva de crecimiento, los resultados se muestran en la figura No.3. Podemos observar que el crecimiento de la levadura es exponencial ya que se va incrementando mientras aumenta el periodo de incubación y por consiguiente aumenta el valor de la absorbancia. Se observó que su fase logarítmica inicia a la hora 3 y su fase estacionaria es de las 27 a las 36 horas, finalmente la fase de muerte después de las 39 horas.

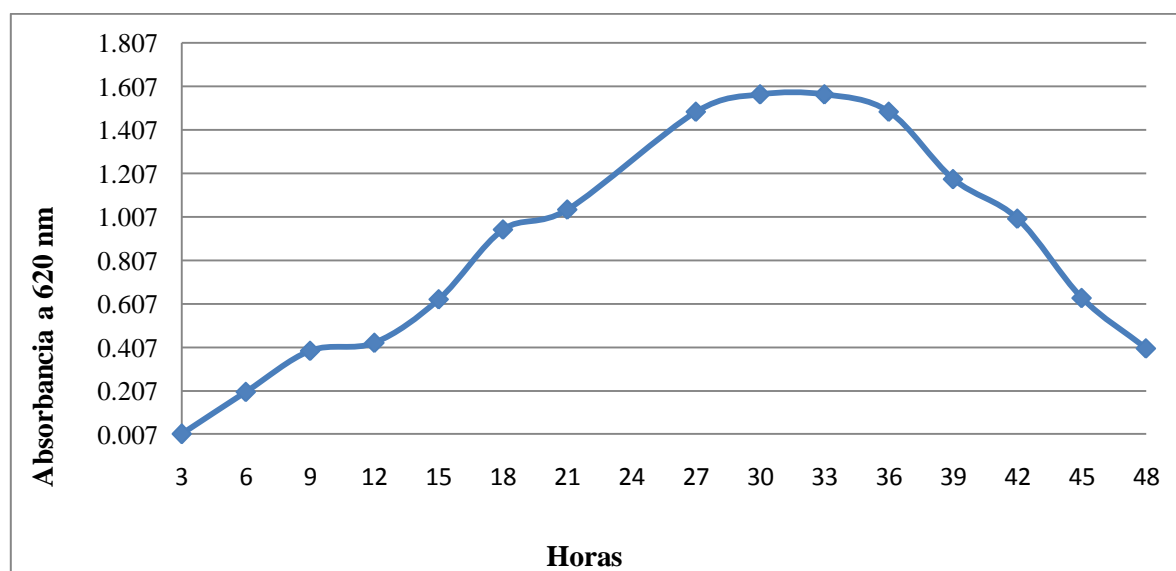


Fig. 2 Curva de crecimiento de *K.marxianus*

7.1.5 Prueba de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en presencia de la levadura *K. marxianus* en un ensayo *in vitro*

Como se observa en la figura 3 solamente la concentración de 1×10^8 en donde se encuentra la cepa de *Klebsiella pneumoniae* muestra el halo de inhibición con un diámetro de 1 cm a la derecha, 1.8 cm a la izquierda, 2.3 cm en la parte superior y en la parte inferior 1.7 cm en la concentración de 1×10^8 , con las demás concentraciones de 1×10^6 , 1×10^4 , y 1×10^2 no

presenta ninguna inhibición en el crecimiento del microorganismo patógeno. Por otro lado los resultados correspondientes a la inoculación de la cepa de *Escherichia coli* en donde se puede observar en la figura 4 que en ninguna de las concentraciones estudiadas se presentó un halo de inhibición, por lo que la placa se observa completamente cubierta por la cepa patógena.

Con la finalidad de observar la morfología de las cepas patógenas y confirmar si realmente había inhibición se tomaron muestras al azar de los pozos y del sitio donde se observó la inhibición. Después de realizar la tinción de Gram, se observó en las figura 5 que en el pozo que tenía la mayor concentración de la levadura no se observó la presencia de la cepa patógena, mientras que en los demás pozos se observó la presencia de *Klebsiella pneumoniae* debido a que su crecimiento no fue inhibido, así mismo en la figura se observó la presencia de la *Escherichia coli* lo que muestra que no existe ninguna inhibición en su crecimiento.

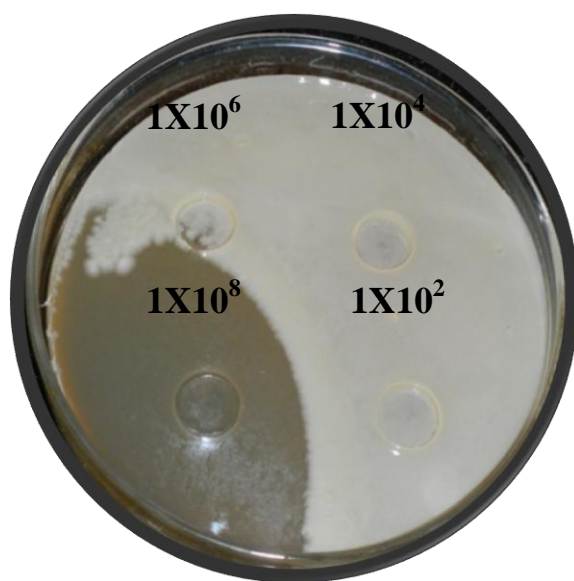


Fig. 3. Ensayo de inhibición de crecimiento de *K. marxianus* y *Klebsiella pneumoniae* Placa de Petri con doble capa de agar, la primer capa con Agar YPD y la segunda capa; Agar Tripticaseina inoculada con *Klebsiella pneumoniae*, en los pozos diferentes concentraciones de *K.marxianus*.

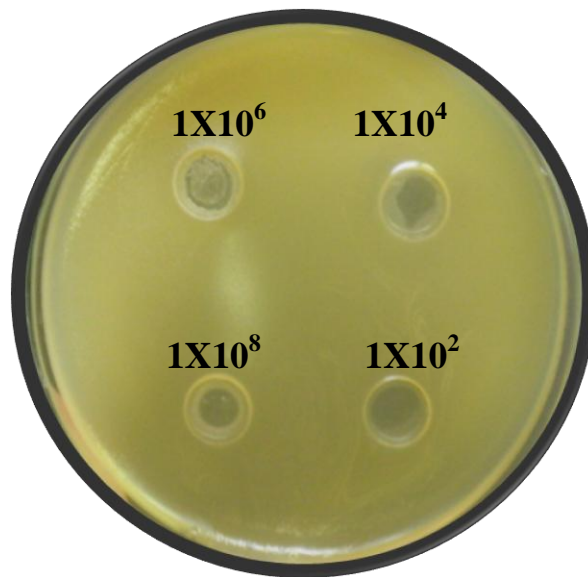


Fig. 4. Ensayo de inhibición de crecimiento de *K.marxianus* y *Escherichia coli*. Placa de Petri con doble capa de agar, la primer capa con Agar YPD y la segunda capa; Agar Tripticaseína inoculada con *Escherichia coli*, en los pozos diferentes concentraciones de *K.marxianus*.

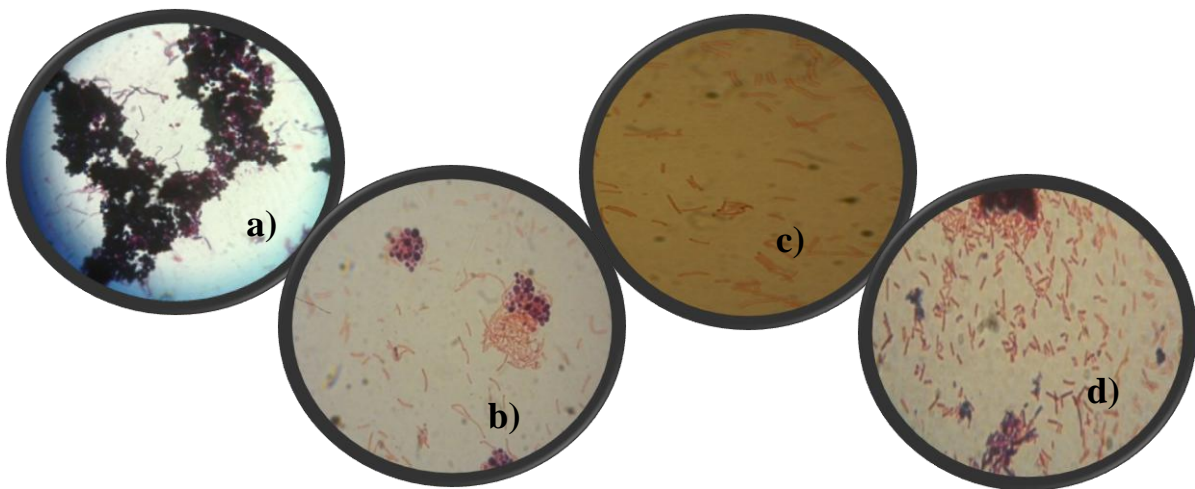


Fig. 5. Observación de las muestras del ensayo de inhibición del crecimiento contra un microorganismo patógeno en la figura a) se observó la presencia de *K. marxianus*, mientras que en las figuras b,c,y d) se observaron bacterias correspondientes a la cepa patógena.

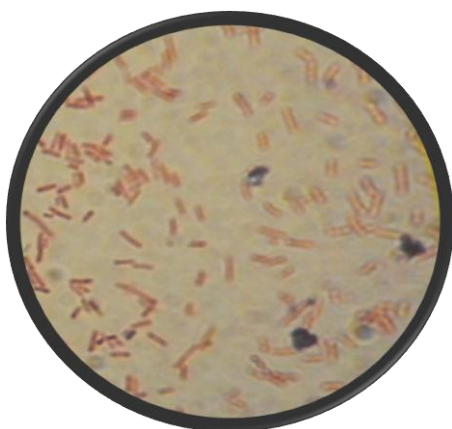


Fig. 6. Tinción de Gram tomada de los pozos inoculados con *K. marxianus* en presencia de *Escherichia coli* para el ensayo de inhibición Se observan bacilos Gram negativos de la enterobacteria *Escherichia coli* sin la presencia de *K.marxianus* en el ensayo de inhibición de crecimiento.

7.2 Determinación de la capacidad probiótica de levadura *K. marxianus* mediante ensayos *in vivo*

7.2.1 Establecimiento de la levadura *K. marxianus* en un modelo de intestino grueso e intestino delgado de ratones CD-1

En la tabla 4 que se muestra a continuación se observó que de acuerdo a las muestras que fueron tomadas a partir de las placas sembradas con el contenido intestinal de intestino grueso e intestino delgado, existe la presencia de la levadura *K. marxianus* por lo tanto fue capaz de establecerse en el tejido intestinal y mantenerse viable, a partir de la imagen

Tabla 4 Resultados del ensayo de establecimiento de la levadura *K. marxianus* en un modelo de intestino grueso y delgado en ratones CD-1

Ratón	Intestino Delgado	Intestino Grueso
R1	+	+
R2	+	+
R3	+	+
R4	+	+
R5	+	+

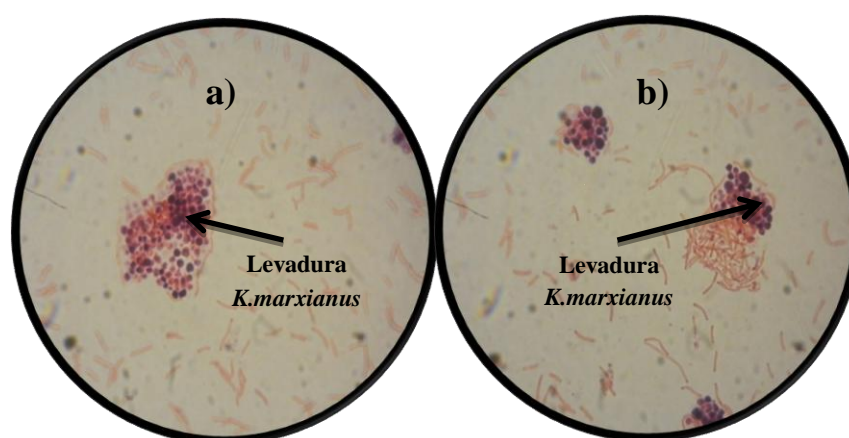


Fig. 7 Levadura *K. marxianus* presente en intestino grueso y delgado del ratón 1, se observa en la imagen marcada con los incisos a y b.

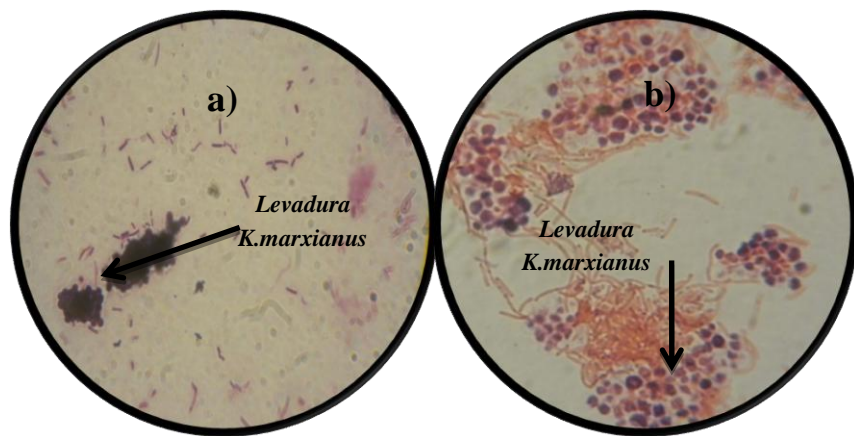


Fig. 8. Levadura *K. marxianus* presente en intestino grueso y delgado del ratón 2, se observa en la imagen marcada con los incisos a y b.

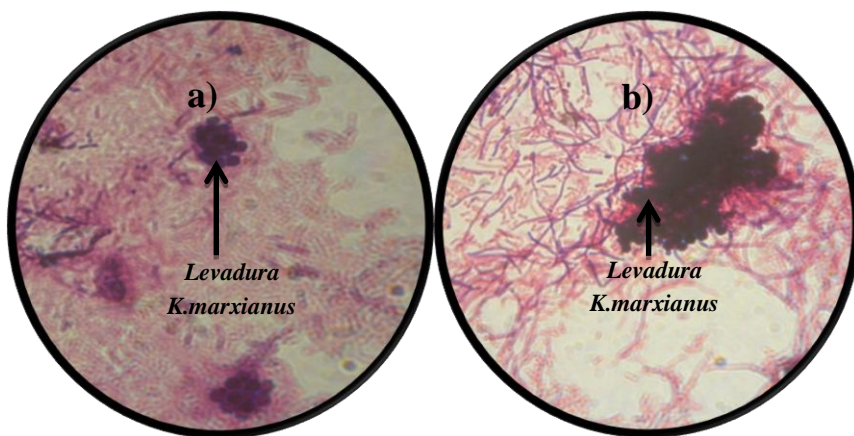


Fig. 9. Levadura *K. marxianus* presente en intestino grueso y delgado del ratón 3, se observa en la imagen marcada con los incisos a y b.

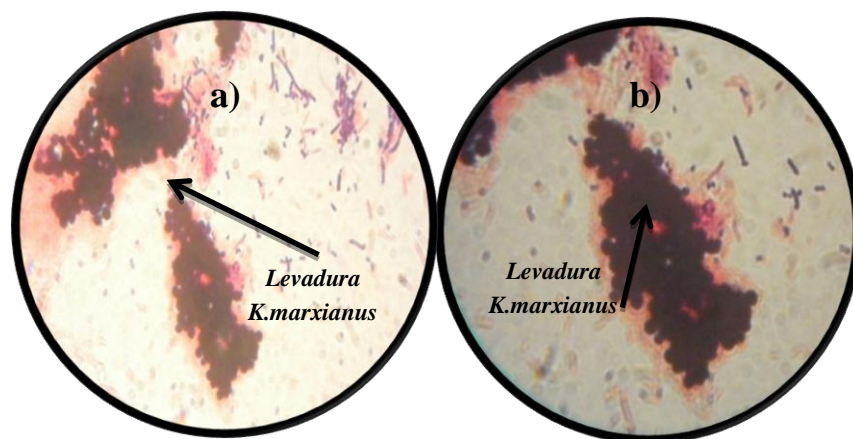


Fig. 10. Levadura *K. marxianus* presente en intestino grueso y delgado del ratón 4, se observa en la imagen marcada con los incisos a y b.

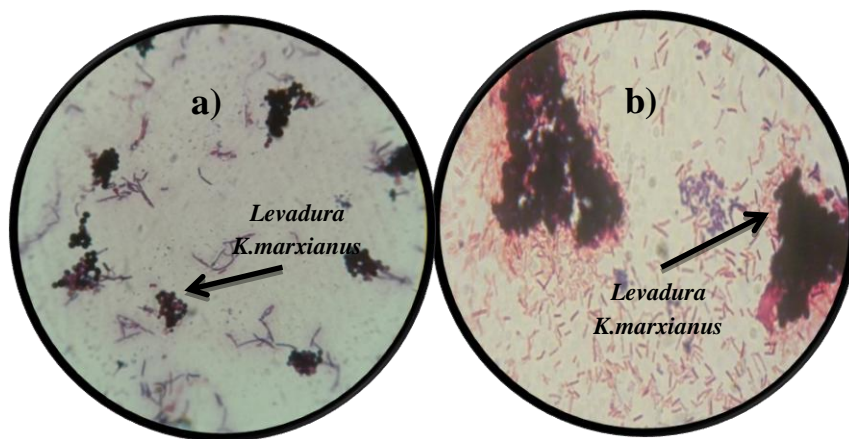


Fig. 11. Levadura *K. marxianus* presente en intestino grueso y delgado del ratón 5, se observa en la imagen marcada con los incisos a y b.

7.2.2 Cinética de colonización de la levadura *K. marxianus* en un modelo de ratones CD-1

Con la finalidad de observar si la levadura es capaz de colonizar el intestino grueso y delgado en un modelo animal se realizó un ensayo de colonización y como se muestra en la tabla 5, podemos observar que los primeros tres días de sacrificio si existe la presencia de la levadura *K. marxianus* en intestino delgado, intestino grueso y heces, sin embargo, en el cuarto y quinto día de sacrificio y recolección de heces, no hubo presencia de la levadura en las muestras que fueron tomadas.

Tabla 5 Cinética de colonización de *K. marxianus* en un modelo de ratones CD-1.

Ratón	Intestino Delgado	Intestino Grueso	Heces
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	-	-	-
5	-	-	-

7.2.3 Cinética de colonización de la levadura *K. marxianus* en un modelo de ratones CD-1 durante 7 días de administración

Con el objetivo de comprobar el tiempo que *K. marxianus* era capaz de permanecer en el modelo animal después de administra la levadura durante 7 días se realizó un ensayo de cinética de colonización que mostró los siguientes resultados; en la tabla 6 se observó que después de un periodo de administración de la levadura durante 7 días a partir del día ocho hasta el día número diez existe la presencia de *K. marxianus* tanto en el intestino delgado, el intestino grueso y las heces, a partir del día número once y doce únicamente se observa el crecimiento de la levadura en el intestino grueso y no hay presencia ni en intestino delgado ni en heces.

Tabla 6 Cinética de colonización de la levadura *K.marxianus* durante 7 días de administración en ratones.

Conteo de colonias UFC/MI			
Ratón	Intestino Grueso	Intestino Delgado	Heces
1	1630	212	130
2	1272	101	91
3	984	57	42
4	686	-	-
5	369	-	-

VIII. DISCUSIÓN

La prueba de tolerancia a sales biliares con *K. marxianus* permitió observar que era una levadura muy resistente, mucho mayor que la reportada en otros estudios. Por ejemplo Fietto (2004) (107) reporta que hay levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* que pueden soportar concentraciones de sales biliares de hasta 0.15% p/v, sin embargo según Gilliland (2004) (108) la concentración que debe resistir un microorganismo probiótico es de 0.30% (p/v) de sales biliares y la mayoría de las especies de levaduras crecen incluso en presencia de 0.75% de sales biliares. Sin embargo para el presente estudio se encontró que hasta en la mayor concentración se presentó crecimiento de las levaduras en 24 horas de incubación, por lo que la levadura *K. marxianus* cumple con este criterio de un microorganismo probiótico e incluso rebasa más del doble de lo que propone Gilliland (2004) (65). Kühle (2005) (109) reportó que cepas de levaduras como *S. cerevisiae* y *S. var. boulardii* mostraron resistencia a concentraciones de sales biliares de 0.30% (p/v) observando que dichas cepas crecían incluso después de 4 horas de incubación, para el estudio de *K. marxianus* el mayor periodo de incubación fue de 24 horas lo cual representa una ventaja al ser un mayor periodo de incubación.

Durante los trabajos realizados se pudo observar que *K. marxianus* tuvo un extenso rango de temperatura de crecimiento desde 27°C hasta 43°C lo que la hace termoresistente a diferencia de otras levaduras que son más sensibles a la temperatura; por ejemplo según Kumura (2004), (56) al exponer diferentes levaduras a la presencia de bilis, fueron capaces de crecer siempre y cuando se incubaran a 27°C, otras levaduras como *Saccharomyces sp* podían crecer en presencia de sales biliares a temperaturas de 37°C, temperatura a la que otras levaduras se inhibían.

Al igual que la resistencia a sales biliares, los experimentos demostraron resistencia a diferentes valores de pH lo que también nos conduce a pensar en su alta capacidad para resistir el paso por el tracto gastrointestinal y lo que le da la característica de ser un buen probiótico. En este sentido muchas de las definiciones de un microorganismo probiótico enfatizan que es importante que lleguen viables al intestino Ouwehan (1999) (110); la

primer barrera que tienen que sobrevivir es la acidez estomacal, los valores normales de pH del estómago en el ser humano son de 1 a 3, después del consumo de alimentos el pH se eleva rápidamente a 5, con un periodo de transito estomacal que va de 2.5 a 4 horas, dependiendo de la ingesta de alimentos (Cummings, 2004). (111) *K. marxianus* fue sometida a valores de 1.5 a 4 por hasta 24 horas, siendo capaz de sobrevivir a estas condiciones. Seguramente existen sistemas intracitoplásmicos que permiten regular su equilibrio ácido base tal como sucede con otras levaduras lo cual hace que puedan soportar variaciones de pH, particularmente la acidez tal como lo menciona Fujimori (2007), (112) quien señala que la tolerancia de las levaduras a diferentes valores de pH se debe a los antiportadores de la bomba de Na^+/H^+ que poseen las levaduras, estos son proteínas encontradas en la membrana citoplasmática así como en los organelos de las células, estas proteínas catalizan el intercambio de cationes monovalentes (Na^+ o K^+) y H^+ a través de las membranas, de tal modo que regulan las concentraciones de cationes y pH a nivel citoplasmático y de los organelos. Viegas (113) (1998) y Sychrovae (1999) (114) sugieren que existe otro mecanismo de las levaduras que las ayuda a regular el pH y la concentraciones, se trata de una ATPasa, codificada por el gen PMA 1 que se localiza en la membrana citoplasmática, esta puede crear un gradiente electroquímico de protones que conduce al transporte secundario de solutos que está implicado en mantenimiento del pH cercano a la neutralidad y que además de ser un componente crítico de la adaptación de la levadura a los ácidos., es útil para muchas de las funciones fisiológicas de la levadura como la toma de nutrientes y la regulación intracelular.

Narendranath (2001) (115) encuentra en uno de sus estudios que, levaduras del genero *S. cerevisiae* son resistentes a la adición de ciertos ácidos al medio de cultivo debido a los componentes del medio utilizado YPG, tales como extracto de levadura, peptona y glucosa pueden conferirle cierta protección a la levadura en condiciones de estrés, lo que pudo haber contribuido para que los recuentos realizados a los diferentes valores de pH se mantuvieran, a pesar de las condiciones ácidas del medio. Los resultados de la levadura *K. marxianus* a diferentes valores de pH muestran que es capaz de tolerar un valor de pH de 1.5, por periodos de incubación de 24 horas.

Los resultados de resistencia a pH permitió pensar en una resistencia a jugo gástrico; El jugo gástrico presenta una concentración de sales de aproximadamente 0.5% (p/v) que como se mencionó anteriormente genera la activación de mecanismos de resistencia, debido a proteínas de membrana que internalizan estas sales y a vacuolas que participan en su posterior degradación, esta secreción presenta a su vez una barrera enzimática compuesta principalmente de enzimas proteolíticas tales como pepsina que degrada proteínas; todos estos factores pueden ser letales para muchos microorganismos Según Martins (2005). (116) Debido a lo anterior si un microorganismo sobrevive a estas condiciones puede llegar a tener potencial como microorganismo probiótico, la levadura *Kluyveromyces marxianus* fue capaz de crecer en presencia de jugo gástrico en un pH de 1.5 y de 7.0. En un estudio realizado por Fietto (2004) (107) reporta que al someter a dos cepas de levaduras, (*S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* var *boulardii*) a jugo gástrico artificial por un periodo de 60 minutos, no se observa diferencias significativas en la viabilidad de las cepas, esto demuestra que la levadura *K. marxianus* presenta una buena resistencia al jugo gástrico, porque incluso después de 24 horas de incubación pudo mantenerse viable (1.6×10^3 UFC/mL), este mismo autor reportó que las levaduras (*S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* var *boulardii*) expresan proteínas específicas en respuesta a condiciones de estrés, incluida la resistencia a jugo gástrico, lo que sugiere la relación con la adaptación y la sobrevivencia en el medio.

Los probióticos deben ser capaces de competir selectivamente con otros microorganismos contribuyendo a su eliminación, control y regulación. Es ampliamente reconocida la capacidad de algunas levaduras para inhibir microorganismos patógenos tal es caso de *Saccharomyces boulardii* quien es capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos pertenecientes a las cepas de *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, y algunas otras bacterias enteropatógenas (117-119). Rodríguez (119) reporta que la levadura *Saccharomyces boulardii* es capaz de inhibir la multiplicación de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, y *Klebsiella pneumoniae* en estudios in vitro, sin embargo *K. marxianus* para el presente estudio no fue capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, aunque si inhibió el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* en el ensayo in vitro, cabe mencionar que en algunas ocasiones la inhibición del crecimiento de un microorganismo

patógeno puede darse no solo por la producción de sustancias antimicrobianas, sino por la competencia en la superficie de adhesión en el intestino, o por la competencia por nutrientes, por lo que no se puede descartar por completo que *K. marxianus* no pueda inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y de algunas otras bacterias patógenas por antagonismo directo.

Otro factor importante del cual depende la inhibición de un microorganismo patógeno es de la cantidad del inóculo. Al analizar la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*, Salvatierra (120) reportó que el efecto depende de la concentración del inóculo y del tipo de patógeno lo que sugiere que el efecto inhibitorio del microorganismo probiótico depende tanto de la especie de microorganismo patógeno y su concentración así como de la concentración del microorganismo inhibidor, los resultados obtenidos para la prueba de inhibición de microorganismos patógenos coincide con los resultados encontrados por Rodrigues (119). Resultados de Cavazzoni (1998) (121) reporta que el número de microorganismos que debe contener un preparado comercial probiótico debe ser de $10^6 - 10^8$ UFC/mL, para que al llegar a las células blanco puedan actuar sobre el huésped, el inóculo del cual se partió para el presente estudio fue de 1×10^8 UFC/mL disminuyendo el número de UFC/mL después del periodo de incubación en los experimentos de resistencia a pH, sales biliares y jugo gástrico, lo que sugiere que es necesario que el inóculo inicial sea mayor para asegurar que las levaduras que se someten a las sales biliares se conserven en una cantidad necesaria para poder proporcionar un beneficio al huésped.

La adhesión de las células en un tejido o mucosa es un evento complejo e involucra el contacto de las células con la superficie del tejido, esto puede ser afectado por la composición y la estructura de las células que están en la membrana o tejido y que interactúan con el medio, así mismo, la capacidad de adhesión de ciertas levaduras a las células epiteliales y en la mucosa es una importante característica para ser consideradas como probióticos. Boris (1997) (122) y Del Re (2000) (123) mencionan que la capacidad de agregación de algunas levaduras está relacionada con las propiedades de adhesión de las células, sin embargo cabe mencionar que existen pocos estudios relacionados con la

adhesión de las células en la mucosa en intestinos que han sido extraídos. Collado (2005) (124) reportó que existe adhesión de microorganismos probióticos como los lactobacilos del género *Lactobacillus rhamnosus* LT705, siguiendo el mismo procedimiento pero el crecimiento se realizó en medio MRS que es específico para el crecimiento de lactobacilos.

Aunque el termino colonización no es preciso aun en el caso de microorganismos probióticos, Freter define que la colonización intestinal se presenta cuando una población bacteriana permanece estable en el tracto gastrointestinal a lo largo del tiempo, sin necesidad de ser reintroducida periódicamente; no obstante, Rönkä (125) utiliza un criterio menos restrictivo donde menciona que para que la colonización sea positiva es suficiente que el microorganismo colonizador se encuentre presente en un coprocultivo después de la ingestión, lo que simplemente significa que ha sido capaz de conservar su viabilidad a lo largo de su recorrido por el tracto gastrointestinal, en el caso de *K. marxianus*, que fue administrada en una sola ocasión, logró mantenerse en el tracto digestivo durante tres días sin necesidad de realizar un nuevo inóculo diariamente. Flariano (126) menciona que existen pocas levaduras que han sido estudiadas en modelos animales, tal es el caso de *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae*. Él mismo también menciona que las levaduras y bacterias que son aisladas de productos fermentados tienen mayor posibilidad de instalarse y mantenerse en el organismo debido a que tienen una mayor adaptación al estrés, que sufren durante la fermentación, tal es el caso de *K. marxianus* al haber sido aislada del pulque, se puede deber a eso que se logró su instalación en el tracto gastrointestinal en el modelo animal.

Los resultados de la inoculación de *k. marxianus* durante siete días consecutivos coinciden con los publicados por Alander (1997) (127) quien administra lactobacilos de forma consecutiva durante una semana y al igual que en la presente investigación, el tiempo de colonización aumenta, encontrando que la levadura *K. marxianus* se encuentra presente hasta cinco días después de la última inoculación, aumentando el tiempo de colonización de tres días a cinco días, probablemente esto se debe a que se introduce un mayor número de levaduras con la inoculación diaria, y esto permite que sigan colonizando por más tiempo.

IX. CONCLUSIONES

- *Kluyveromyces marxianus* es capaz de sobrevivir a condiciones del tracto gastrointestinal como son el pH ácido, concentraciones de sales biliares de 0.05% hasta un 0.30%, y a un jugo gástrico artificial hasta en un periodo de 24 horas.
- La colonización de las levaduras ocurre en el intestino grueso y delgado, al menos por un periodo de 72 horas.
- Un solo inóculo permite la colonización de *K. marxianus* hasta por un periodo de 72 horas en ratones, y la inoculación diaria durante siete días aumenta el periodo de colonización hasta por cinco días después de la última inoculación.
- *K. marxianus* inhibe el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*.
- *K. marxianus* es considerado un probiótico de acuerdo a los criterios establecidos.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Pot B, Tsakalidou, E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*, *Lactobacillus* Molecular biology. From genomic to probiotic. Brazil2009. 67 p.
2. Åsa L, Torkel, W. *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics: Caister Academic Press; 2009.
3. Freter R, Abrams, G.D. . Function of various intestinal bacteria in converting germfree mice to the normal state. *Infect Immun*. 1972 6:8.
4. Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U, Malik P, Deb S, Black RE. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(6):374-82.
5. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. 1965;147(3659):747-8.
6. Y. Sanz JD. Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediatr Esp*. 2008;1(66):5. Epub 06/06/07.
7. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potential for probiotics. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(2 Suppl):476S-83S. Epub 2001/02/07.
8. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Variation in human intestinal microbiota with age. *Digestive and Liver Disease*. 2002;34, Supplement 2(0):S12-S8.
9. Sperti CS. Probiotics. Westport, Connecticut: Avi publishing company; 1971. 120 p.
10. Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health*. 1974;29:5.
11. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991;32:4.
12. Havenaar R, Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. London, England.: Chapman and Hall,; 1992. 15 p.
13. Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, et al. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *International journal of food microbiology*. 1998;44(1-2):93-106. Epub 1998/12/16.

14. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(2 Suppl):361S-4S. Epub 2001/02/07.
15. Mattila-Sandholm T, Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., De Vos, W., Dunne, C., Fonden, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reiniero, R., Saarela, M., Salminen S., Saxelin, M., Schiffrin, E. Shanahan, F., Vaughan, E., Wright, A. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci Tech* 2000;10(12):7. Epub 399.
16. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(4):331-41. Epub 2003/04/02.
17. T. M. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus Casei* :*Strain Shirota*. *InterJFood Microbiol*. 1998;41:7.
18. Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *The Journal of pediatrics*. 2005;147(2):186-91. Epub 2005/08/30.
19. Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, et al. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical and experimental immunology*. 2006;143(1):103-9. Epub 2005/12/22.
20. Lee DJ, Drongowski RA, Coran AG, Harmon CM. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatric surgery international*. 2000;16(4):237-42. Epub 2000/07/18.
21. Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*. 2003;52(6):827-33. Epub 2003/05/13.
22. Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;286(4):G613-26. Epub 2004/03/11.
23. Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology*. 2002;68(6):3031-4. Epub 2002/06/01.

24. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;31(4):453-7.
25. Massi M, Ioan, P., Budriesi, R., Chiarini, A., Vitali, B., Lammers, K.M. . Effects of probiotic bacteria on gastrointestinal motility in guinea-pig isolated tissue. . *World J Gastroenterol* 2006;12:8.
26. Quigley EM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res*. 2010;61(3):213-8.
27. Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiology Letters*. 1987;46(3):343-56.
28. Jiang T, Savaiano DA. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Digestive diseases and sciences*. 1997;42(11):2370-7. Epub 1997/12/17.
29. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science & Technology*. 1999;10(3):107-10.
30. Belviso S, Giordano M, Dolci P, Zeppa G. In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. *Dairy Sci Technol*. 2009;89(2):169-76.
31. Djouzi Z, Andrieux C, Degivry MC, Bouley C, Szylit O. The association of yogurt starters with *Lactobacillus casei* DN 114.001 in fermented milk alters the composition and metabolism of intestinal microflora in germ-free rats and in human flora-associated rats. *The Journal of nutrition*. 1997;127(11):2260-6. Epub 1997/11/14.
32. Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C. Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *The Journal of nutrition*. 1999;129(12):2231-5. Epub 1999/11/26.
33. Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *The British journal of nutrition*. 2006;96(3):570-7. Epub 2006/08/24.

34. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*. 1995;59(2):171-200. Epub 1995/06/01.
35. Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*. 2000;47(5):646-52. Epub 2000/10/18.
36. Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, et al. Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2002;32(4):563-70. Epub 2002/04/26.
37. Arribas B RM, Camueso D, Zarzuela A, Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharm*. 2008;49(1):25.
38. De Simone C, Salvadori, B.B., Negri, R., Ferrazzi, M., Baldinelli, L., Vesely, R. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma-interferon by con a-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Nutrition reports international*. 1986;33(3): 419-33. Epub Mar 1986.
39. Dunne C, Murphy, M.,Flynn, S.,O'Mahony, L.,O'Halloran, S.,Feeney M.,Morrissey, D.,Thornton, G., Fitzgerald, G.,Daly, G., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan³, G., Shanahan, F., & Kevin J. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999;76:279–92.
40. Miraglia del Giudice M, De Luca MG. The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2004;38(6 Suppl):S84-5. Epub 2004/06/29.
41. Tomioka H, Sato K, Saito H. The protective activity of immunostimulants against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Journal of medical microbiology*. 1992;36(2):112-6. Epub 1992/02/01.
42. Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2000;30 Suppl 2:S2-7. Epub 2000/04/05.

43. Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;73(2 Suppl):430S-6S. Epub 2001/02/07.
44. Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea. *The American journal of gastroenterology*. 2000;95(1 Suppl):S16-8. Epub 2000/01/14.
45. Guandalini S. Probiotics for children: use in diarrhea. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006;40(3):244-8. Epub 2006/04/25.
46. Hosoda M, Hashimoto H, He F, Morita H, Hosono A. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. *Journal of dairy science*. 1996;79(5):745-9. Epub 1996/05/01.
47. Aso Y, Akazan H. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. BLP Study Group. *Urologia internationalis*. 1992;49(3):125-9. Epub 1992/01/01.
48. Oatley JT, Rarick MD, Ji GE, Linz JE. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of food protection*. 2000;63(8):1133-6. Epub 2000/08/17.
49. El-Nezami H, Mykkanen H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum. *Journal of food protection*. 2000;63(4):549-52. Epub 2000/04/20.
50. Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, et al. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. *Inflammatory bowel diseases*. 2010;16(1):112-24. Epub 2009/08/05.
51. Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease. *Hepato-gastroenterology*. 2000;47(31):49-56. Epub 2000/02/26.
52. Obrador A RJ. Definitions. En: *Management of Inflammatory Bowel Disease*. Barcelona: Prous Science; 1994. 200 p.
53. Malchow HA. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *Journal of clinical gastroenterology*. 1997;25(4):653-8. Epub 1998/02/06.
54. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999;354(9179):635-9. Epub 1999/08/31.

55. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. Current opinion in infectious diseases. 2002;15(5):501-6. Epub 2003/04/11.
56. Kumura H, Tanoue Y, Tsukahara M, Tanaka T, Shimazaki K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. Journal of dairy science. 2004;87(12):4050-6. Epub 2004/11/17.
57. Sanders ME. Probiotics: Considerations for human health. Nutr Rev. 2003;61:99.
58. Salmien SJ. Uniqueness of probiotic strains. IDF Nutr News Lett. 1996;5:3.
59. Dunne C, Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K. Probiotics : from myth to reality. demonstration of functionality in animals models of disease and in human clinical trials. Antonie van Leeuwenhoek. 1999;76:13.
60. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical microbiology reviews. 2003;16(4):658-72. Epub 2003/10/15.
61. Salminen SJ, Gueimonde, M., Isolauri, E. Probiotics That Modify Disease Risk. The Journal of nutrition. 2005;135:4.
62. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters. 1998;167(2):185-9.
63. Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and environmental microbiology. 2006;72(3):1729-38. Epub 2006/03/07.
64. Goldin BR, Gorbach, S.L. Probiotics, the Scientific Basis. Chapman & Hall, London, 1992.
65. Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. Journal of dairy science. 1990;73(4):905-11.
66. Simon GL, and Gorbach, S. L. Physiology of Gastrointestinal Tract. New York, NY.: Raven Press; 1987.
67. Spencer JF, & Ragout, A.L. Metodos microbiologicos: Humana press; 2001.
68. Fresney R. Cell lines at culture 1990. 10-5 p.

69. de Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(3):1270-3. Epub 2003/03/08.
70. Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:361-84.
71. Atchley WR, Fitch WM. Gene trees and the origins of inbred strains of mice. *Science*. 1991;254(5031):554-8.
72. Benavides F GJ. Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Alcalá: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL). 2003;2:1.
73. Ramos-Cormenzana AF, S.; Ferrer-Cebrian, R.; Monteoliva-Sanchez, M. Probiotics and biotherapy. 2005.
74. Jakobsen M, Narvhus J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*. 1996;6(8–9):755-68.
75. Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*. 2001;34(9):791-6.
76. Koedrith P, Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C., Messenguy, F. Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. . *Sci Asia* 2008;34:147–52.
77. Scanlan PD, Marchesi, J.R. . Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and -independent analysis of faeces. *The ISME*. 2008;2:1183–93.
78. Suh SO, McHugh JV, Pollock DD, Blackwell M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycological research*. 2005;109(Pt 3):261-5. Epub 2005/05/26.
79. Gatesoupe FJ. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* (Amsterdam, Netherlands). 2007;267(1-4):20-30.
80. Fleet GH. Yeasts in dairy products. *Journal of applied microbiology*. 1990;68(3):13. Epub March 1990.

81. Lopez-Daz TM, Santos, J.A., Prieto, M., Garca-Lopez, M.L., Otero, A. . Mycoflora of a traditional Spanish blue cheese. *Neth Milk Dairy J.* 1995;49:8.
82. Senses-Ergul S, Agoston R, Belak A, Deak T. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International journal of food microbiology.* 2006;108(1):120-4.
83. Sarmiento A. Obtencion y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicacion probiotica Bogota: Pontificia Universidad Javeriana; 2003.
84. Fredlund E, Druvefors, U., Boysen, E.M., Lingsten, K., Schnurer, J. . Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. . *FEMS Yeast Res.* 2002;2:395–402.
85. Posteraro B, Sanguinetti M, Romano L, Torelli R, Novarese L, Fadda G. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of food microbiology.* 2005;103(3):295-304.
86. Pena-Alvarez A, Diaz L, Medina A, Labastida C, Capella S, Vera LE. Characterization of three agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004;20:1-2.
87. Chellapandian M, Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M., Lopez-Munguia, A. Production and properties of a dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from ‘pulque’, a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998;21(1-2):51-6.
88. Escalante A, Elena Rodríguez M, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters.* 2004;235(2):273-9.
89. Herrera ST. Ciclo de conferencias «Mi vida en la ciencia». In: Suárez TH, editor. *Impresiones de un breve recorrido de la memoria a través de más de medio siglo en la UNAM*; Mexico, D.F.2003. p. 32.
90. Mattila-Sandholm T, Myllärinen, P., Crittenden, R. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J.* 2002;12:10.

91. Anderson RK, Calvo J, Serrano G, Payne GC. [A study of the nutritional status and food habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. 1946]. *Salud Publica Mex.* 2009;51(4):S657-74.
92. Backstrand JR, Allen LH, Black AK, de Mata M, Pelto GH. Diet and iron status of nonpregnant women in rural Central Mexico. *The American journal of clinical nutrition.* 2002;76(1):156-64.
93. Marvan LL, Palacios, G. B., Perez, L. A. B. *Bebidas alcoholicas. Sistema mexicano de equivalentes* 2001. p. 71.
94. Ortiz de M. B. *Aztec Medicine, Health and Nutrition.*

Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1990;38:539-65.
95. Cervantes-Contreras M, Pedroza-Rodríguez, A.M. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS.* 2007;5:20.
96. Narro-Robles JG-A, J. H. Correlación ecológica entre consumo de bebidas alcohólicas y mortalidad por cirrosis hepática en México. *Salud Pública de México.* 1997;39:217-20.
97. Backstrand JR, Allen, L.H., Martinez, E., Pelto, G.H. Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Pub Health Nutr.* 2001;4:10.
98. Sanches Marroquin A. Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. *Microbiological reviews.* 1967;9:4.
99. Abundis VB. Monografía del agave pulquero. Puebla, Mexico 2007.
100. Cervantes RMC. Los agaves (*Agave spp*). En: *Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México.* Mexico: UNAM, Instituto de Geografía; 2002. 83-73 p.
101. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(3):339-54.
102. Roostita R, Fleet GH. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International journal of food microbiology.* 1996;31(1-3):205-19.

103. S. L-R. "Shigelosis (disentería bacilar)".
. Sal en Tab
2002; 8:4.
104. Aguirre A, & Poutou, R. . Obtencion de un biopreparado a partir de cepas nativas de levaduras para ser empleado como probiótico: Pontificia universidad Javeriana; 2003.
105. Collins C. Metodos Microbiologicos Acribia, Zaragoza, España.1989.
106. Vanegas MC, González LM, Arévalo SA. Capacidad bactericida de *Bifidobacterium* sp. aislada de leche materna y de heces de neonatos, frente a los principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Infectio*. 2010;14:241-7.
107. Juliana LRF, Raquel SA, uacute, jo, Frederico NV, atilde, et al. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian journal of microbiology*. 2004;50(8):615-21.
108. Buckenhüskes HJ. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS microbiology reviews*. 1993;12(1-3):253-71.
109. van der Aa Kuhle A, Skovgaard K, Jespersen L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International journal of food microbiology*. 2005;101(1):29-39.
110. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;82(1-4):279-89.
111. Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *West J Med*. 1999;171(3):187-91.
112. Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, et al. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(8):1199-204.
113. Viegas C, Almeida, P., Cavaco, M., Correia, I. The H1-ATPase in the plasma membrane of *Sacharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in Octanoic Acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability *Applied and Enviromental Microbiology* 1998;64:5.
114. Sychrovaé H, Ramirez, J.,Peña, A. Involvement of Nha1 antiporter in regulation of intracellular pH in *Sacharomyces cerevisiae* *Microbiology Letters* 1999;171:6.

115. Narendranath V, Thomas, K., Ingledew, W., . Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Sacharomyces cerevisiae* in minimal medium. *Jounal of Industrial Microbiology and Tecnology*. 2001;3:7.
116. Martins F, Ferreria, F., Penna, F., Rosa, C., Drumond , R., Neves, M., Nicol,J. Estudio del potencial probiótico de *Sacharomyces cerevisiae* a traves de ensayos in vitro. *Revista de biología y ciencias de la tierra*. 2005|;5:13.
117. Elmer GW, Corthier G. Modulation of *Clostridium difficile* induced mortality as a function of the dose and the viability of the *Saccharomyces boulardii* used as a preventative agent in gnotobiotic mice. *Canadian journal of microbiology*. 1991;37(4):315-7.
118. Vidon N, Huchet B, Rambaud JC. [Influence of *Saccharomyces boulardii* on jejunal secretion in rats induced by cholera toxin]. *Gastroenterol Clin Biol*. 1986;10(1):13-6.
119. Rodrigues AC, Nardi RM, Bambirra EA, Vieira EC, Nicoli JR. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *J Appl Bacteriol*. 1996;81(3):251-6.
120. Salvatierra MM, A. Gamboa, M. & Arias, M.L. . Evaluación del efecto de cultivos de probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa. *Arch Latinoam Nut*. 2004);54 (3):298-302.
121. Cavazonni V, Adami, A., Castrovilli, G. Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as a probiotic. *British Poultru Science*. 1998;39:4.
122. Boris S, Suárez JE, Barbés C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, avaginal isolate. *Journal of applied microbiology*. 1997;83(4):413-20.
123. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 2000;31(6):438-42.
124. Collado MC, Hernandez M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. *Journal of food protection*. 2005;68(5):1034-40.

125. Ronka E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International journal of food microbiology*. 2003;83(1):63-74.
126. Flariano S. M. RMDN, Rosa M. E., Carlos A. R., Maria J. Neves., Jacques, R. Nicoli. Screening of yeasts as probiotics based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and protect against enteropathogen challenge in mice. *J Gen Appl Microbiol* 2005;51:10.
127. Alander M, Korpela, R., Saxelin, M., Vilponen, T., Salema, T. Persistence of colonization of Human Colonic Mucosa by a probiotic strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;65:4.